

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE NO  
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E NA FARMACOCINÉTICA DA  
VENLAFAXINA EM RATOS WISTAR ADULTOS**

**ALFENAS  
2019**

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE NO  
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E NA FARMACOCINÉTICA DA  
VENLAFAXINA EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa B. Boralli Marques

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia G. Ruginsk Leitão

**ALFENAS  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A657e Aquino Júnior, Milton Kennedy.  
Efeitos do hipotireoidismo induzido experimentalmente no  
comportamento depressivo e na farmacocinética da venlafaxina em ratos  
wistar adultos / Milton Kennedy Aquino Júnior – Alfenas/MG, 2019.  
79 f.: il. –

Orientadora: Vanessa B. Boralli Marques.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Hipotireoidismo. 2. Depressão. 3. Cloridrato de Venlafaxina. 4.  
Farmacocinética. I. Marques, Vanessa B. Boralli. II. Título.

CDD-615.9

**MILTON KENNEDY AQUINO JÚNIOR**

**“EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO INDUZIDO EXPERIMENTALMENTE NO  
COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E NA FARMACOCINÉTICA DA  
VENLAFAXINA EM RATOS Wistar ADULTOS”**

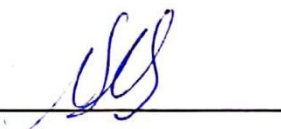
A Banca examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas  
pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 4 / 9 / 19

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Alessandra Cristina Pupin Silvério  
Instituição: UNIFENAS

Assinatura: 

Prof. Dr. Renato Rizo Ventura  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me iluminado e guiado durante todo o mestrado.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanessa Bergamin Boralli Marques e minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pelo apoio, paciência, dedicação, confiança e conhecimentos transmitidos para fosse possível a concretização desse trabalho.

Aos meus colegas Rodrigo, Rafaela, Bianca, Tássia, Ayla, Mariana, Mayara, Alberto, Henrique, Rafael e Juliana, obrigado pelas sugestões, ideias, conselhos e contribuições, que foram de imenso valor para a realização dessa dissertação.

A todos amigos e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos (LATF) e o Laboratório de Fisiologia pelos conhecimentos transmitidos, companheirismo, apoio e pelos momentos de descontrações.

Agradeço aos meus alunos de iniciação científica Rafael Lourenço e Larissa Almeida pelo apoio na execução dos experimentos.

À Luciana Chavasco pelo suporte oferecido para realização das dosagens hormonais das amostras coletadas.

Aos meus pais Milton e Lucimara, e a minha irmã Gabriela, por todo incentivo, apoio, amor e principalmente por acreditarem em mim.

À minha namorada Maria Emília, por ter permanecido ao meu lado durante toda essa etapa, pelo companheirismo, amor, paciência e apoio nos momentos difíceis.

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

O hipotireoidismo é um distúrbio com alta incidência mundial, sendo sua maior causa relacionada à deficiência de iodo na dieta. Indivíduos com hipotireoidismo geralmente desenvolvem comorbidades relacionadas à falta dos HT; como exemplo de uma dessas doenças está a depressão. Em alguns casos, pacientes com depressão não respondem bem ao tratamento com fármacos antidepressivos, sendo uma possível causa para este fato, a falta de reposição hormonal de tiroxina (T4). Sendo assim, o presente trabalho propõe avaliar se o hipotireoidismo induzido experimentalmente, com reposição ou não de T4, altera a farmacocinética da venlafaxina, avaliando se existe relação entre hipotireoidismo e comportamento depressivo em ratos Wistar machos. A avaliação foi feita comparando-se ratos com indução experimental de hipotireoidismo por duas formas diferentes, através da tireoidectomia (Tx) e tratamento com metimazol (MMI), com reposição e sem a reposição hormonal de T4 (20µg/kg/dia v.o). Foram considerados animais controles do procedimento cirúrgico aqueles submetidos à cirurgia simulada (SHAM). Para caracterização do quadro de hipotireoidismo foram realizadas dosagens hormonais de T4 livre, hormônio estimulador de tireócitos (TSH), bem como a medida das massas de tecidos relacionados à função do eixo tireoidiano [hipófise, adeno-hipófise, tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) perigonadal e a tireoide]. Para avaliação do comportamento depressivo foram realizados os testes de nado forçado e de preferência à sacarose. Em relação à farmacocinética, foram realizadas coletas de sangue para análise de venlafaxina através da canulação nos tempos de 0-12h; as dosagens foram realizadas em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, em método desenvolvido e validado segundo normas da ANVISA. De acordo com os resultados, os grupos sem reposição hormonal, Tx e MMI, e o grupo Tx com reposição apresentaram concentrações plasmáticas menores de T4 livre em relação ao grupo SHAM, respectivamente (0,3; 0,3; 1,1 vs. 1,7ng/dL); o grupo MMI com reposição apresentou valores de T4 semelhantes ao SHAM. Sobre as análises de massa da adeno-hipófise, tireoide e TAM; foram observados valores reduzidos no TAM dos grupos sem reposição, Tx e MMI, em comparação ao SHAM, respectivamente (73,4; 75,9 vs. 12,6mg/100g) e aumentadas para a adeno-hipófise (3,4; 3,1 vs. 2,2mg/100g) e a tireoide (14,0 vs. 4,7mg/100g MMI vs. SHAM). Esses resultados apontam o correto funcionamento do mecanismo de retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Em relação ao comportamento depressivo, somente o grupo MMI sem reposição apresentou maior tempo de imobilidade (153,6 vs. 86,9s) e menor preferência por sacarose (80,0 vs. 94,8%) comparado ao SHAM. A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos mostraram alterações no grupo Tx sem reposição hormonal, como o aumento de AUC (4403,7 vs. 1037,5ng.h/mL), meia-vida (2,9 vs. 1,3h), concentração máxima (880,4 vs. 432,2ng/mL), diminuição do clearance (4,2 vs. 19,8L/h/kg), frente ao grupo SHAM. Diante dos resultados, é possível concluir que o início de comportamento depressivo foi caracterizado no grupo MMI sem reposição hormonal e o modelo de indução baseado na tireoidectomia foi capaz de alterar os parâmetros farmacocinéticos da venlafaxina sugerindo que a falta dos HT presentes no hipotireoidismo interfere na farmacocinética da venlafaxina.

Palavras-chave: Hipotireoidismo. Depressão. Cloridrato de Venlafaxina. Farmacocinética.

## ABSTRACT

Hypothyroidism is a high global incidence disorder, and its most common cause is dietary iodine deficiency. Individuals with hypothyroidism usually develop comorbidities related to the lack of TH; the depression is example of one these diseases. In some cases, patients with depression do not respond well to treatment with antidepressant drugs, and a possible cause for this fact is the lack of thyroxine hormone replacement (T4). Therefore, the present work proposes to evaluate whether experimentally induced hypothyroidism, with or without T4 replacement, alters venlafaxine pharmacokinetics, assessing whether there is a relationship between hypothyroidism and depressive behavior in male Wistar rats. The evaluation was made by comparing rats with experimental induction of hypothyroidism in two different ways, by thyroidectomy (Tx) and methimazole treatment (MMI), with and without T4 hormone replacement (20µg /kg/day v.o). Control animals of the surgical procedure were those submitted to sham surgery (SHAM). In order to characterize the hypothyroidism, the free T4 and thyroid stimulating hormone (TSH) dosages were measured, as well as the measurement of the thyroid axis function related tissue masses [adenohypophysis, brown adipose tissue (TAB), perigonadal white adipose tissue (TAM) and thyroid)]. For the depressive behavior evaluation, forced swimming and sucrose ingestion tests were performed. Regarding pharmacokinetics, blood samples were collected for venlafaxine analysis through cannulation at time 0-12h; The dosages were performed in gas chromatography coupled with mass spectrometry, in a method developed and validated according to ANVISA standards. According to the results, the groups without hormone replacement, Tx and MMI, and the group Tx with replacement presented lower free T4 plasma concentrations compared to the SHAM group, respectively (0,3; 0,3; 1,1 vs. 1,7ng/dL); the MMI group with replacement presented T4 values similar to SHAM. On the mass analysis of the adenohypophysis, thyroid and TAM; reduced values were observed for TAM in the non-replacement groups, Tx and MMI, compared to SHAM, respectively (73,4; 75,9 vs. 12,6mg/100g) and increased for the adenohypophysis (3,4; 3,1 vs. 2,2mg/100g) and thyroid (14,0 vs. 4,7mg/100g MMI vs. SHAM). Together, these results point to the correct functioning of the negative feedback mechanism in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. Concerning depressive behavior, only the non-replacement MMI group had a longer immobility time (153,6 vs. 86,9s) and a lower preference for sucrose (80,0 vs. 94,8%) compared to SHAM. Evaluation of pharmacokinetic parameters showed changes in the Tx group without hormone replacement, such as increased AUC (440,7 vs. 1037,5ng.h / mL), half-life (2,9 vs. 1,3h), maximum concentration (880,4 vs. 432,2ng / mL), and decreased clearance (4,2 vs. 19,8L/h/kg) compared to the SHAM group. Based on the results, it can be concluded that the depressive-like behavior was characterized in the MMI group without hormone replacement and the thyroidectomy-based induction model was able to alter the pharmacokinetic parameters of venlafaxine, suggesting that the lack of HT present in hypothyroidism interferes with the pharmacokinetics of venlafaxine.

Keywords: Hypothyroidism. Depression. Venlafaxine Hydrochloride. Pharmacokinetics.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema demonstrando a divisão dos grupos em estudo.....                                     | 27 |
| Figura 2 - Etapas da Tireoidectomia. ....   | 29 |
| Figura 3 - Foto durante a realização do teste de nado forçado, demonstrando o recipiente utilizado..... | 30 |
| Figura 4 - Teste Rota rod em execução. ....   | 31 |
| Figura 5 - Etapas do procedimento de canulação. ....  | 33 |
| Figura 6 - Dosagens de T4 livre no plasma dos animais em estudo.....                                    | 43 |
| Figura 7 - Dosagens de TSH no plasma dos animais em estudo.....   | 44 |
| Figura 8 - Relação das massas dos tecidos coletados .....   | 46 |
| Figura 9 - Evolução de massa corporal dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento .....       | 47 |
| Figura 10 - Delta de massa corporal dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento .....         | 48 |
| Figura 11 - Ingestão de líquido dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento .....             | 49 |
| Figura 12 - Tempo de imobilização no teste de nado forçado em relação aos grupos em estudo.....         | 50 |
| Figura 13 - Teste de preferência por sacarose.....  | 51 |
| Figura 14 - Teste de Rota rod .....   | 52 |
| Figura 15 - Resultado da quantificação de proteína nas amostras utilizadas para farmacocinética .....   | 53 |
| Figura 16 - Cromatogramas das substâncias analisadas em modo SIM. ....                                  | 54 |
| Figura 17 - Curva analítica de venlafaxina em plasma.....   | 55 |
| Figura 18 - Cromatograma do efeito residual.....  | 58 |
| Figura 19 - Cromatograma para seletividade. ....  | 59 |
| Figura 20 - Curvas de concentração plasmática de venlafaxina em função do tempo .....                   | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Sintomas e sinais do hipotireoidismo. ....  | 18 |
| Tabela 2 - Relação entre os grupos e o tempo de imobilização em segundos no nado forçado. ....   | 49 |
| Tabela 3 - Parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de venlafaxina em plasma de ratos por CG/MS na faixa de concentração de 50 a 1000 ng/mL de plasma. .... | 55 |
| Tabela 4 - Precisão e exatidão intra-dias e interdias. ....  | 56 |
| Tabela 5 - Limite inferior de quantificação para venlafaxina. ....   | 57 |
| Tabela 6 - Dados referentes ao teste de estabilidade de curta duração. ....  | 60 |
| Tabela 7 - Dados referentes ao teste de estabilidade de pós processamento. ....  | 60 |
| Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos dos grupos em estudos para venlafaxina administrada por via oral em ratos (dose: 20mg/kg). ....   | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| 5-HT:              | Serotonina  |
| ATA:               | Associação Americana de Tireoide                          |
| AUC:               | Área sob a curva  |
| BDNF:              | Fator neurotrófico derivado do cérebro                    |
| CG-MS:             | Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas   |
| C <sub>máx</sub> : | Concentração máxima                                       |
| CQA:               | Controle de qualidade de alta concentração                |
| CQB:               | Controle de qualidade de baixa concentração               |
| CQM:               | Controle de qualidade de média concentração               |
| CV:                | Coeficiente de variação                                   |
| D1:                | Desiodase tipo 1  |
| D2:                | Desiodase tipo 2  |
| D3:                | Desiodase tipo 3  |
| DHGA:              | Doença hepática não alcoólica                             |
| DPa:               | Desvio padrão do intercepto com eixo y da curva analítica |
| DPR:               | Desvio padrão relativo                                    |
| EPM:               | Erro padrão da média                                      |
| EPR:               | Erro padrão relativo                                      |
| FMN:               | Fator de matriz normalizado                               |
| FSH:               | Hormônio folículo estimulante                             |
| GH:                | Hormônio do crescimento                                   |
| HT:                | Hormônios da tireoide                                     |
| i.p.:              | Administração intraperitoneal                             |
| IC:                | Inclinação da curva analítica                             |
| IC 95%:            | Intervalo de confiança de 95%                             |
| IMC:               | Índice de massa corporal                                  |
| IRSNs:             | Inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina    |
| ISRS:              | Inibidores seletivos da recaptação de serotonina          |
| LD:                | Limite de detecção  |
| LDL:               | Lipoproteína de baixa densidade                           |
| LH:                | Hormônio luteinizante                                     |
| LIQ:               | Limite de quantificação                                   |
| LSQ:               | Limite superior de quantificação                          |
| LTP:               | Potencial de longa duração                                |
| MMI:               | Metimazol   |
| MS:                | Espectrômetro de massa                                    |
| NIS:               | Simporte sódio iodeto                                     |
| ODV:               | O-desmetilvenlafaxina                                     |
| p.c.:              | Peso corporal   |

PI: Padrão interno  
PTU: 6-n-propil-2-tiouracil  
RPM: Rotações por minuto  
SIM: Modo ion seletivo  
SNC: Sistema nervoso central  
SNS: Sistema nervoso simpático  
SPE: Extração em fase sólida  
 $t_{1/2}$ : Meia vida  
T1: Monoiodotirosina  
T2: Diiiodotirosina  
T3: Triiodotironina  
T4: Tiroxina  
TAB: Tecido adiposo branco  
TAM: Tecido adiposo marrom  
 $t_{máx}$ : Tempo para alcançar a concentração máxima no plasma  
TPO: Tireoperoxidase  
TRH: Hormônio liberador de tireotrofina  
TSH: Hormônio estimulante da tireoide  
Tx: Tireoidectomizado  
UCP1: Proteína de desacoplamento 1  
UI: Unidades internacionais  
v.o: Via oral  
VLDL: Lipoproteína de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>1</b>    | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>14</b> |
| <b>2.1</b>  | <b>Regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-tireoidiano</b>              | <b>15</b> |
| <b>2.3</b>  | <b>Modelos de indução de hipotireoidismo em ratos</b>                    | <b>18</b> |
| <b>2.4</b>  | <b>Comorbidades relacionadas</b>   | <b>20</b> |
| 2.4.1       | Déficit de atenção   | 20        |
| 2.4.2       | Obesidade leve   | 21        |
| 2.4.3       | Depressão  | 21        |
| <b>2.5</b>  | <b>Fármacos para tratamento da depressão</b>                             | <b>23</b> |
| 2.5.1       | Venlafaxina  | 23        |
| <b>3</b>    | <b>JUSTIFICATIVA</b>   | <b>25</b> |
| <b>4</b>    | <b>OBJETIVOS</b>   | <b>26</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Objetivo geral</b>  | <b>26</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Objetivos específicos</b>   | <b>26</b> |
| <b>5</b>    | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>27</b> |
| <b>5.1</b>  | <b>Animais</b>   | <b>27</b> |
| <b>5.2</b>  | <b>Modelo experimental de Hipotireoidismo em ratos</b>                   | <b>28</b> |
| 5.2.1       | Tireoidectomia   | 28        |
| 5.2.2       | Tratamento com metimazol   | 29        |
| <b>5.3</b>  | <b>Testes comportamentais para determinação da depressão</b>             | <b>29</b> |
| 5.3.1       | Nado forçado   | 30        |
| 5.3.2       | Teste de preferência por sacarose  | 30        |
| <b>5.4</b>  | <b>Teste do Rota-rod</b>   | <b>31</b> |
| <b>5.5</b>  | <b>Dosagens hormonais</b>  | <b>32</b> |
| <b>5.6</b>  | <b>Extração de tecidos para determinação da massa tecidual</b>           | <b>32</b> |
| <b>5.7</b>  | <b>Protocolo para avaliação farmacocinética da venlafaxina</b>           | <b>32</b> |
| <b>5.8</b>  | <b>Quantificação de proteínas totais</b>                                 | <b>33</b> |
| <b>5.9</b>  | <b>Metodologia de análise da Venlafaxina em plasma de rato por GC/MS</b> | <b>34</b> |
| 5.9.1       | Equipamentos   | 34        |
| 5.9.2       | Reagentes  | 35        |
| 5.9.3       | Preparo de solução   | 35        |
| 5.9.4       | Metodologia de análise   | 36        |
| <b>5.10</b> | <b>Validação da metodologia analítica</b>                                | <b>37</b> |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 5.10.1      | Linearidade  | 37        |
| 5.10.2      | Precisão e exatidão  | 37        |
| 5.10.3      | Limite inferior de quantificação   | 38        |
| 5.10.4      | Limite de detecção   | 38        |
| 5.10.5      | Efeito Matriz  | 39        |
| 5.10.6      | Efeito Residual  | 39        |
| 5.10.7      | Seletividade   | 40        |
| 5.10.8      | Estabilidade   | 40        |
| <b>5.11</b> | <b>Análise Farmacocinética</b>   | <b>41</b> |
| <b>5.12</b> | <b>Análise estatística</b>   | <b>41</b> |
| <b>6</b>    | <b>RESULTADOS</b>  | <b>43</b> |
| <b>6.1</b>  | <b>Caracterização do modelo de hipotireoidismo</b>                       | <b>43</b> |
| <b>6.2</b>  | <b>Testes comportamentais para avaliação da depressão</b>                | <b>49</b> |
| 6.2.1       | Nado forçado   | 49        |
| 6.2.2       | Teste de preferência por sacarose  | 50        |
| <b>6.3</b>  | <b>Rota rod</b>  | <b>51</b> |
| <b>6.4</b>  | <b>Quantificação de proteína totais</b>                                  | <b>52</b> |
| <b>6.5</b>  | <b>Metodologia de análise da Venlafaxina em plasma de rato por GC/MS</b> | <b>53</b> |
| <b>6.6</b>  | <b>Validação da metodologia analítica</b>                                | <b>54</b> |
| 6.6.1       | Linearidade  | 54        |
| 6.6.2       | Precisão e exatidão  | 56        |
| 6.6.3       | Limite inferior de quantificação   | 56        |
| 6.6.4       | Limite de detecção   | 57        |
| 6.6.5       | Efeito Matriz  | 57        |
| 6.6.6       | Efeito Residual  | 57        |
| 6.6.7       | Seletividade   | 58        |
| 6.6.8       | Estabilidade   | 59        |
| <b>6.7</b>  | <b>Análise Farmacocinética</b>   | <b>60</b> |
| <b>7</b>    | <b>DISCUSSÃO</b>   | <b>63</b> |
| <b>7.1</b>  | <b>Caracterização do modelo de hipotireoidismo</b>                       | <b>63</b> |
| <b>7.2</b>  | <b>Testes comportamentais para avaliação da depressão</b>                | <b>66</b> |
| 7.2.1       | Nado forçado   | 66        |
| 7.2.2       | Preferência por sacarose   | 67        |
| <b>7.3</b>  | <b>Rota rod</b>  | <b>68</b> |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>7.4</b> | <b>Considerações gerais sobre o método analítico desenvolvido.....</b> | <b>68</b> |
| <b>7.5</b> | <b>Análise farmacocinética .....</b>                                   | <b>69</b> |
| <b>8</b>   | <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>72</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>73</b> |
|            | <b>ANEXOS .....</b>  | <b>79</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A glândula da tireoide, através de seus hormônios, regula diversas funções, como o metabolismo dos carboidratos, dos lipídeos e das proteínas, bem como o crescimento e desenvolvimento do organismo. Desregulações nestes processos podem ocorrer, afetando de forma negativa a qualidade de vida de milhares de pessoas ao redor do mundo. Nesse contexto, um dos distúrbios de ocorrência possível é o hipotireoidismo, doença caracterizada pela baixa ou por nenhuma atividade da glândula tireoide, interferindo em vários mecanismos do organismo como, por exemplo, o gasto de energia, a regulação da temperatura corporal e o metabolismo (PESTANA, 2010; RASHID, 2016; GILBERT, 2017).

Em decorrência das alterações hormonais apresentadas no hipotireoidismo surgem comorbidades relacionadas; dentre elas estão: problemas cardíacos, elevado índice de colesterol, aumento de peso, déficit de atenção e depressão (CHAKER et al., 2017; NASCIMENTO, 2010). A depressão é transtorno mental de alta incidência nos dias atuais, provocando uma queda na qualidade de vida dos indivíduos afetados (PIETRACCI et al., 2012; WHO, 2017). Por diversas vezes pacientes que apresentam este quadro clínico são tratados apenas com antidepressivos, uma vez que o diagnóstico de hipotireoidismo pode ainda não ter sido realizado. Dessa forma, estes indivíduos não apresentam melhoras devido à falta da reposição hormonal de tiroxina (T4), deixando o tratamento ineficiente (BAUER; HEINZ; WHYBROW, 2002; BERENT et al., 2014).

Nesse contexto, verificar se a falta dos hormônios da tireoide (HT) afeta diretamente a farmacocinética da venlafaxina, um antidepressivo, pode ajudar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do hipotireoidismo e a relacionar a ineficiência dos antidepressivos no caso de depressão, uma vez que os HT regulam diversas funções no organismo.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-tireoidiano

A glândula da tireoide pesa cerca de 20g em homens e 17g nas mulheres, medindo de 4 a 6 cm de comprimento. Está localizada ântero-lateralmente à traqueia e é composta por 2 lóbulos (direito e esquerdo) que são ligados por um istmo fino que atravessa a traqueia. Uma mínima quantidade de indivíduos possui um pequeno lobo piramidal que é originado no istmo e está sobre a cartilagem da tireoide. Possui rica irrigação, sendo drenada por três veias em cada lado: veias tireoide superior, média e inferior (NASCIMENTO, 2010; OZGUR et al., 2011; ROBINSON; MIDDLETON, 2014; RASHID, 2016; TEKSOZ et al., 2017). A unidade funcional da tireoide é o folículo, composto por epitélio simples de células, os tireócitos, responsáveis pela secreção e iodinação da tireoglobulina, proteína que é precursora e responsável pelo armazenamento dos HT. Entre os folículos, estão presente as células C ou parafoliculares, produtoras de calcitonina (BERNE; LEVY, 2010; NASCIMENTO, 2010). Para produção dos HT é necessário que haja a captação do iodeto pelos tireócitos por meio de simporte sódio/iodeto (NIS). Ao se encontrar no citoplasma da célula o iodeto é transportado para o lúmen folicular por uma proteína chamada pendrina, neste local ele é oxidado pela tireoperoxidase (TPO), e o iodo resultante se liga aos resíduos de tirosina presente na tireoglobulina para formar os precursores dos HT, monoiodotirosina (T1) e diiodotirosina (T2), sendo uma ou duas moléculas de iodo ligadas a tirosina respectivamente. A tireoglobulina é então clivada liberando os precursores T1 e T2 que se ligam e formam os hormônios 3,5,3',5'-tetraiodotironina (T4) por meio da ligação de duas moléculas de T2; 3,5,3'-triiodotironina (T3) mediante a ligação de T1 e T2 e 3,3'5'-triiodotironina (T3 reverso), forma inativa dos HT (PESTANA, 2010; ROBINSON; MIDDLETON, 2014; RASHID, 2016). Aproximadamente 90% da produção da tireoide é de T4, 10% de T3 e menos de 1% de T3 reverso. Como o T4 não possui atividade, é produzido e liberado em grande quantidade para conversão periférica em T3 (forma ativa), realizada pela ação das enzimas desiodases. São conhecidos 3 tipos de desiodases: tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) tipo 3 (D3), sendo a D1 expressa em tecidos com alto fluxo sanguíneo, como no

fígado, rins e musculatura esquelética, a D2 no sistema nervoso central (SNC), hipófise, tecido adiposo marrom e placenta, e a D3 nos tecidos em desenvolvimento, principalmente no SNC (BERNE; LEVY, 2010; NUNES, 2003).

Os HT possuem diversos efeitos fisiológicos importantes no organismo, como efeitos cardiovasculares (aumento da frequência cardíaca, aumento na velocidade e na força de contração do miocárdio, elevação da pressão sistólica e diminuição da diastólica), no metabolismo basal (aumento da taxa basal de consumo de oxigênio e produção de calor), respiratórios (elevação da frequência respiratória em repouso), na musculatura esquelética (glicose e a glicogenólise aumentados e o glicogênio e a fosfocreatina diminuídos em excesso de HT) e no sistema nervoso (regulação da velocidade e o ritmo do desenvolvimento do sistema nervoso, aumenta a vivacidade, o estado de alerta e a resposta para vários estímulos). Possuem ainda funções essenciais no metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas. (ARAUJO, 2002; BERNE; LEVY, 2010; PESTANA, 2010).

A síntese e secreção dos HT é mediada pelos níveis de hormônio estimulante da tireoide (TSH), hormônio secretado pela parte anterior da hipófise (adeno-hipófise), o qual possui uma subunidade  $\alpha$  denominada subunidade glicoproteica, sendo essa semelhante para os hormônios TSH, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), e uma subunidade  $\beta$  que é específica para o TSH, na qual confere a ligação em seu receptor nas células foliculares da tireoide. A produção de TSH é regulada pelos níveis dos HT, que em altas concentrações exercem efeito inibitório em sua produção, e pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que estimula sua síntese e secreção (NUNES, 2003; NASCIMENTO, 2010).

O TRH é um hormônio produzido pelo subgrupo de neurônios parvicelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo um tripeptídico com uma glutamina ciclizada na região N-terminal e uma região C-terminal amidada. Quando se liga ao seu receptor localizado nos tireotrofos na hipófise, age estimulando a transcrição gênica e a síntese de TSH (BERNE; LEVY, 2010; PESTANA, 2010). O aumento nos níveis de T3 e T4 inibe a secreção de TSH, tanto direta como indiretamente, suprimindo a liberação de TRH através do mecanismo de retroalimentação negativa (NASCIMENTO, 2010; JANSSEN et al., 2015; WEBER et al., 2016).

## 2.2 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo caracteriza-se por uma síndrome na qual há uma deficiência na produção dos hormônios T3 e T4, podendo ocorrer por diversos fatores, como doenças autoimunes, deficiência de iodo, doenças infiltrativas ou desenvolvimento anormal da glândula. É classificado em primário, secundário, terciário e periférico. O hipotireoidismo primário define-se por uma disfunção na própria glândula da tireoide, apresentando níveis de T3 e T4 diminuídos e níveis de TSH elevados; no secundário a causa é gerada através da deficiência de TSH, o terciário devido à deficiência de TRH e o periférico pela falta ou deficiência da expressão das desiodases em diversos tecidos (CHAKER et al., 2017). A prevalência é entre 0,3-3,7% nos EUA e entre 0,2-5,3% na Europa, sendo maior em países onde existe deficiência no consumo de iodo. Há predominância maior em mulheres do que homens e aumenta de acordo com a idade (> 65 anos) (MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006; CHAKER et al., 2017; GILBERT, 2017). Segundo uma meta-análise realizada por Madariada et al., 2014, a incidência média de disfunção tireoidiana não diagnosticada na Europa é de cerca 6,7%, sendo que para o hipotireoidismo não diagnosticado é entre 4,7-5,1%.

Dentre os sintomas mais recorrentes no hipotireoidismo em adultos estão: fadiga, letargia, intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, alteração de voz e pele seca, podendo variar em relação ao sexo e a idade dos indivíduos (CHAKER et al., 2017; NASCIMENTO, 2010). A Tabela 1 demonstra os principais sintomas apresentados no hipotireoidismo.

Há também o hipotireoidismo subclínico, que é caracterizado por uma forma leve de insuficiência tireoidiana, apresentando níveis elevados de TSH e níveis de T4 dentro do padrão de referência. Geralmente os pacientes com essa comorbidade são assintomáticos, porém, em alguns casos, podem apresentar os mesmos sintomas do hipotireoidismo, sendo estes agravados com o aumento dos níveis de TSH (PEETERS, 2017).

O diagnóstico do hipotireoidismo geralmente é feito através das dosagens de níveis séricos de TSH e T4 livre, sendo seu tratamento realizado com reposição diária de T4 por via oral (CHAKER et al., 2017).

Tabela 1 - Sintomas e sinais do hipotireoidismo.

|                          | Sintomas   | Sinais   |
|--------------------------|--|--|
| Gerais                   | Intolerância ao frio, fadiga, aumento de peso e rouquidão                                | Hipotermia, baixa taxa metabólica e obesidade leve.  |
| Sistema nervoso          | Letargia, redução de memória, da capacidade de concentração e alteração da personalidade | Sonolência, fala lenta, redução da audição, ataxia, retardo dos reflexos tendinosos, síndrome do túnel do carpo e depressão. |
| Sistema gastrointestinal | Náuseas e constipação  | Aumento da língua e ascite   |
| Sistema respiratório     | Redução da tolerância ao exercício   | Bradycardia, hipertensão arterial leve, derrame pleural e pericárdico.   |
| Sistema reprodutor       | Redução da libido e da fertilidade e alterações menstruais                               | Características secundárias normais.   |
| Pele e anexos            | Pele seca, edema facial e queda de pelos   | Edema de face, mãos e tornozelos, edema periorbitário, palidez e pele amarelada.   |

Fonte: Adaptado de CHAKER et al. (2017); NASCIMENTO, (2010).

### 2.3 Modelos de indução de hipotireoidismo em ratos

A indução do hipotireoidismo em modelos animais é conseguida por meio da diminuição das concentrações dos HT abaixo dos níveis fisiológicos. A Associação Americana de Tireoide (ATA, do inglês *American Thyroid Association*) por meio do Guia para investigar a economia e a ação do hormônio tireoidiano em modelos de roedores e células ( do inglês *American Thyroid Association Guide to Investigating Thyroid Hormone Economy and Action in Rodent and Cell Models*, 2014), traz diversas recomendações relacionadas ao estudo da ação dos hormônios tireoidianos com objetivo de promover a padronização dos estudos, aumentar a comparabilidade e a

reprodutibilidade dos achados experimentais (BIANCO et al., 2014). Segundo o guia, existem diversos procedimentos que podem ser adotados para que se obtenha experimentalmente o quadro de hipotireoidismo sistêmico, dentre eles estão: tireoidectomia total, o uso de substâncias anti-tireoidianas, suspensão das deiodinases ou de transportadores dos HT.

Para indução do hipotireoidismo em roedores deve-se levar em consideração a idade do animal (pré-natal, pós-natal, após o desmame). Pelo fato de que em ratos a secreção do hormônio de crescimento é muito sensível aos níveis dos HT, a massa corporal deve ser monitorada durante o protocolo de indução, tendo em vista que a ausência de crescimento por duas semanas foi proposta como padrão-ouro para definir um estado de hipotireoidismo sistêmico grave (BIANCO et al., 2014). Estudos em modelos animais utilizaram variação na idade do animal: ratos machos com 7 semanas de idade (NAGAO et al., 2011, 2014) e 8-9 semanas (YU et al., 2015), já outros pesquisadores utilizaram ratas prenhas, filhotes em idade pós-natal e após o desmame (HASEGAWA; WADA, 2013).

Através do uso de substância como o metimazol (MMI) na água dos ratos é possível obter um quadro de hipotireoidismo sistêmico, sendo o período para o aparecimento do hipotireoidismo geralmente variável, dependendo de qual substância está sendo utilizado (BIANCO et al., 2014). Um estudo com ratos machos *Wistar* de aproximadamente 170g, utilizando MMI 0,04% em água para um grupo e 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) 0,05% para outro, obteve diminuição significativa dos HT em 4 semanas, com relação a secreção fisiológica normal (WU et al., 2013). Yu et al. (2015) induziram o hipotireoidismo em ratos machos *Sprague-Dawley* com 8 semanas através da administração do iodo<sup>131</sup> nas concentrações de [5 mCi/kg (milicurie por quilograma), injeção intragástrica], observando redução relevante dos HT em aproximadamente 5 dias, com estabilidade por cerca de 55 dias.

Estudos empregando a técnica de tireoidectomia total em ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* obtiveram com sucesso, sem uso de substâncias indutoras, o hipotireoidismo (MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006; NAGAO et al., 2011, 2014; WU et al., 2013; DA CONCEIÇÃO et al., 2016). Após a cirurgia, os primeiros sinais de êxito são obtidos através da queda em T4 sérico e elevação no TSH; já para a redução de T3 é necessário mais tempo (10-15 dias), pois além de presente no plasma, o mesmo está associado aos tecidos. Para se obter um quadro de hipotireoidismo sistêmico, é necessário aproximadamente 5-8 semanas após a cirurgia. Este quadro

pode ser obtido mais rapidamente com o uso de 0,1% de PTU, substância que inibe a conversão periférica de T4 em T3, combinado com 1% de  $\text{KClO}_4$  e 0,1% de MMI na água potável por três semanas (BIANCO et al., 2014). Da Conceição et al. (2016), tiveram hipotireoidismo induzido com sucesso em ratos machos *Wistar* de aproximadamente 260g através da tireoidectomia, realizando tratamento com 0,03% de MMI diluído em água por 20 dias.

O processo de tireoidectomia gera um risco significativo de lesões na glândula paratireoide, interferindo em concentrações séricas de cálcio (RIZVI et al., 2012; BIANCO et al., 2014; YU et al., 2015). Este fato pode ser relacionado ao aumento da pressão intracraniana, gerando convulsões, depressão e psicose (RIZVI et al., 2012), porém segundo Bianco et al. (2014) ao se realizar tireoidectomia total em rato de aproximadamente 100g, as glândulas paratireoides são preservadas, variando de acordo com as habilidades cirúrgicas e a anatomia das paratireoides.

Outra possibilidade de se obter animais com hipotireoidismo, é através da aquisição de roedores geneticamente modificados nos genes do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, apresentando mutação que interrompe a síntese ou a secreção dos HT (BIANCO et al., 2014).

## **2.4 Comorbidades relacionadas**

Indivíduos com hipotireoidismo podem desenvolver variadas enfermidades decorrente da deficiência hormonal. Algumas delas são relacionadas a seguir.

### **2.4.1 Déficit de atenção**

Uma pesquisa de comparação entre indivíduos com transtorno bipolar que possuíam hipotireoidismo subclínico e indivíduos saudáveis, determinou que em pacientes com hipotireoidismo ocorre diminuição relevante na memória verbal, atenção, linguagem e funções executivas. Este resultado propõe um impacto neurocognitivo resultante da diminuição do HT (MARTINO; STREJILEVICH, 2015).

Estudos em ratos *Wistar* demonstraram que a baixa concentração de HT interfere no desenvolvimento cognitivo provocando um déficit de atenção visual e alteração do comportamento (HASEGAWA; WADA, 2013).

#### 2.4.2 Obesidade leve

A baixa concentração dos HT causada pelo hipotireoidismo reduz o metabolismo basal do organismo, diminuindo assim o gasto de energia, consequentemente causando um aumento de peso (NASCIMENTO, 2010). Kumar et al. (2004) desenvolveram um estudo no qual mulheres que realizavam tratamento com drogas citotóxicas para câncer de mama acabaram desenvolvendo hipotireoidismo relacionado à disfunção da glândula tireoide. Como consequência ao déficit dos HT, essas pacientes apresentaram um ganho de peso característico. O aumento das concentrações de TSH (hipotireoidismo subclínico) está relacionado aos casos de obesidade. Um estudo realizado com 433 pacientes obesos mórbidos (idade média 41, IMC 47 kg/m<sup>2</sup> e 76% mulheres) que passaram por triagem para cirurgia bariátrica, demonstrou que as concentrações elevadas de TSH (60% acima do grupo controle) estavam presente em 32 (8,2%) pacientes sendo que 49 pacientes (11,3%) já estavam sob tratamento com tiroxina antes da cirurgia bariátrica. Este resultado apoia a hipótese de que TSH estimula a diferenciação de pré-adipócitos, induzindo adipogênese (JANKOVIĆ et al., 2012).

Porém o quadro de obesidade não está presente em ratos com hipotireoidismo, isso devido ao fato de que nestes animais o crescimento é contínuo ao longo da vida, e o hormônio de crescimento (GH, do inglês *growth hormone*) é altamente sensível aos níveis dos HT. Com isso, é observado uma redução no peso corporal e crescimento do animal (MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006; WU et al., 2013; BIANCO et al., 2014)

#### 2.4.3 Depressão

A depressão é um transtorno mental caracterizado por sentimento de tristeza, culpa, baixa autoestima e cansaço. Afeta cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo, com prevalência maior em mulheres, sendo uma das principais causas de incapacidade, podendo ocasionar, em casos graves até mesmo suicídio. Dados demonstram que cerca de 800000 pessoas morrem por suicídio a cada ano, estando relacionado a segunda maior causa de morte entre indivíduos de 15 a 29 anos (WHO, 2017).

A depressão é um distúrbio que apresenta diversas origens, sendo uma delas a deficiência de serotonina (5-HT) ou problemas relacionados a seus receptores. Em humanos, pacientes com depressão apresentaram correlação positiva entre a gravidade do quadro depressivo em relação à baixa dos HT; com melhora nos sintomas relacionado ao aumento dos HT (BERENT et al., 2014). Indivíduos com hipotireoidismo demonstraram resposta reduzida a 5-HT, efeito este que foi reversível com a terapia de reposição hormonal de T4. Através da administração de T4 em animais, obteve-se redução da sensibilidade dos autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub>, provocando a desinibição da liberação de serotonina cortical e hipocampal, e aumento da sensibilidade do receptor 5-HT<sub>2</sub> cortical, potencializando a neurotransmissão da 5-HT, efeito este que foi semelhante quando administrado inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS) (BAUER; HEINZ; WHYBROW, 2002). Em estudo utilizando-se de ratos *Wistar* adultos com hipotireoidismo, observou-se prejuízo na capacidade de proliferação do hipocampo, o que determina associação positiva com o comportamento depressivo, e que quando tratados com T4, apresentaram uma recuperação no número de células proliferativas, o que possibilitou observar melhoras evidentes no comportamento semelhante à depressão (MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006).

Estudos contrários demonstram que, apesar da diminuição de 5-HT nas células cerebrais, há níveis aumentados de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo, proteína da família das neurofinas que está relacionada com a promoção da diferenciação e sobrevivência dos neurônios, atuando na modulação da plasticidade sináptica, o que determinaria, em tese, um potencial antidepressivo em animais com hipotireoidismo (CORTÉS et al., 2012; PERITO; FORTUNATO, 2012; YU et al., 2015). Desta maneira, a regulação de HT na depressão pode não estar envolvida somente com os níveis de 5-HT, sendo que em ratos *Sprague-Dawley* com hipertireoidismo foi observado aumento em



concentrações de 5-HT e tempo de imobilização no teste de nado forçado foi maior que no grupo controle, caracterizando comportamento depressivo (YU et al., 2015). Já no estudo descrito por Da Conceição et al. (2016) o mecanismo antidepressivo foi sugerido através do papel dos HT na potenciação de longa duração (LTP, do inglês *Long Term Potentiation*) e na manutenção do BDNF.

## 2.5 Fármacos para tratamento da depressão

Nas últimas décadas, a nova geração de fármacos utilizados para o tratamento da depressão [inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (IRSNs) e os antidepressivos específicos noradrenérgicos e serotoninérgicos] estão no topo das prescrições médicas, fato este, devido a serem associados a uma melhor tolerabilidade e um índice menor de efeitos colaterais em comparação às gerações mais antigas, tricíclicos e os inibidores da monoamina oxidase (PIETRACCI et al., 2012).

### 2.5.1 Venlafaxina

É um antidepressivo IRSNs, com baixa afinidade por receptores de dopamina. Está entre os medicamentos mais utilizados para tratamento de depressão, sendo o primeiro fármaco de sua classe introduzido no mercado (JIANG et al., 2015). Comparando-se com outros fármacos antidepressivos (tricíclicos), a venlafaxina demonstra vantagens: apresenta efeito farmacológico rápido e menor incidência de efeitos colaterais, devido ao fato de não interagir com receptores muscarínicos, histamínicos ou alfa-1 adrenérgicos. Apresenta rápida absorção, com biodisponibilidade de 45% sofrendo metabolização hepática, principalmente pelo CYP2D6, sendo convertida em seu metabólito ativo, O-desmetilvenlafaxina (ODV). Seus efeitos colaterais geralmente são náuseas, tonturas e sonolência (MORENO; MORENO; SOARES, 1999; JIANG et al., 2015; SONG et al., 2017).

Um estudo de comportamento depressivo em ratos machos *Wistar* através do estresse suave repetitivo, utilizando como uma das formas de tratamento a venlafaxina (10mg/kg/dia, 4 semanas) obteve resultados significativos no teste de labirinto elevado, demonstrando melhora no quadro depressivo (LAPMANEE; CHAROENPHANDHU; CHAROENPHANDHU, 2013). Outro estudo, realizado pelos mesmos autores, em situações de ansiedade induzida pelo estresse, apresentou bons resultados nos testes comportamentais após tratamento com venlafaxina (LAPMANEE et al., 2012).

Através da administração de venlafaxina (10mg/kg/dia, v.o) em ratos machos *Sprague–Dawley* por três semanas, constatou aumento significativo na estimulação do BDNF no córtex frontal, em relação ao grupo controle, e inibição do LTP no hipocampo, achados estes que podem estar relacionados ao potencial antidepressivo da venlafaxina (COOKE; GROVER; SPANGLER, 2009).

### 3 JUSTIFICATIVA

O hipotireoidismo é um distúrbio com alta incidência mundial, sendo sua maior causa relacionada à deficiência de iodo na dieta. Geralmente o aparecimento é gradual, levando vários anos para o desenvolvimento de sintomas e sinais notáveis. A doença é caracterizada pela baixa ou falta de produção dos HT pela glândula tireoide, ocorrendo por diversos fatores, como autoimunes, deficiência de iodo, doenças infiltrativas ou desenvolvimento anormal da glândula. Indivíduos com hipotireoidismo acabam desenvolvendo comorbidades relacionadas à falta dos HT, como exemplo a depressão, que se desenvolve com frequência nestes indivíduos. Em alguns casos, pacientes com depressão não respondem bem ao tratamento com fármacos antidepressivos, sendo uma possível causa para este fato a baixa dos HT, que podem interferir na farmacocinética dos antidepressivos. Por este motivo, este trabalho visa caracterizar a presença de comportamento depressivo em ratos com hipotireoidismo e realizar a avaliação farmacocinética da venlafaxina, medicamento utilizado no tratamento da depressão, com o intuito de verificar se a redução dos HT pode influenciar sua farmacocinética e levar a falha ou não na terapia antidepressiva.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar se o hipotireoidismo induzido experimentalmente, com reposição ou não de T4, altera a farmacocinética da venlafaxina, buscando correlacionar o hipotireoidismo a um comportamento depressivo em ratos Wistar machos.

### **4.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos são:

- a) induzir o quadro de hipotireoidismo em ratos machos por meio da tireoidectomia (modelo cirúrgico) e tratamento com MMI (modelo químico), e posteriormente ao tratamento, verificar a presença de comportamento depressivo nesses animais;
- b) desenvolver e validar metodologia de análise utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para quantificação de venlafaxina nas amostras utilizadas para as análises farmacocinéticas.

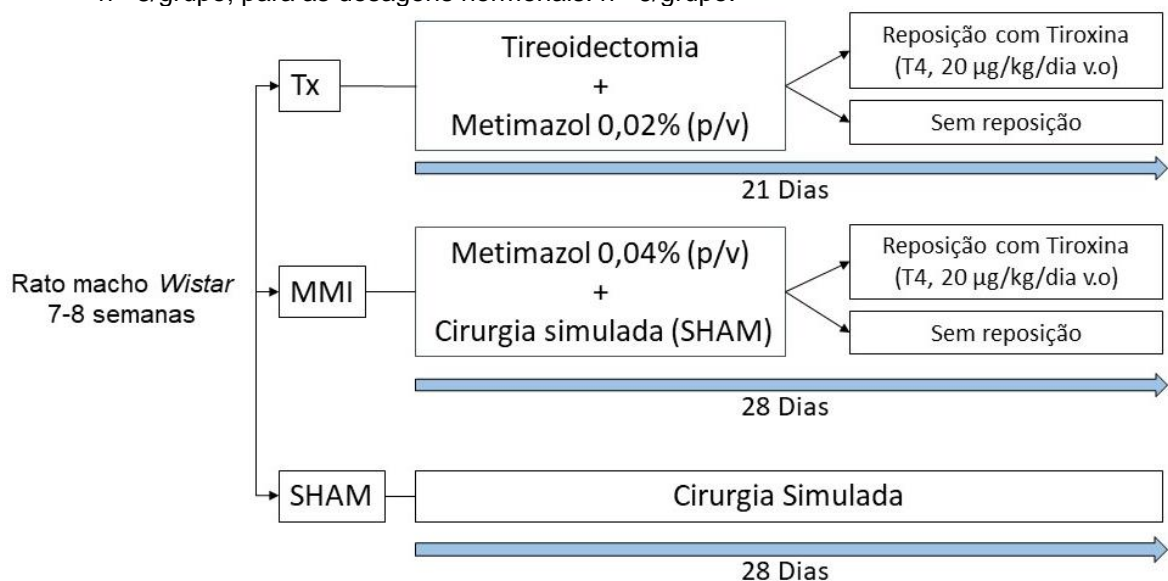
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 70 ratos machos, raça *Wistar*, pesando entre 200-250g, obtidos no biotério central da Universidade Federal de Alfenas, após aprovação pelo comitê de ética local (número de protocolo: 67/2017, ANEXO A), sendo 30 utilizados para realização das dosagens hormonais, no intuito de se comprovar a presença do hipotireoidismo, e o restante para realização da avaliação farmacocinética. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL-MG (S 303B), em sala com temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro a cada 12 horas, com ração e água a vontade. Além disso, os ratos passaram por ambientação nas caixas de polipropileno de 4 a 5 dias antes da realização dos procedimentos.

Os animais, tanto os para as dosagens hormonais quanto para a análise farmacocinética, foram divididos em 3 grupos principais: Tireoidectomizados (Tx), Metimazol (MMI) e Controle (SHAM), no qual os grupos Tx e MMI foram subdivididos em grupos: com reposição hormonal e sem reposição, conforme demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Esquema demonstrando a divisão dos grupos em estudo. Para as análises farmacocinéticas: n= 8/grupo; para as dosagens hormonais: n= 6/grupo.



Fonte: Do autor

As doses dos fármacos utilizados foram: 20µg/kg/dia de T4 por via oral (v.o) através de gavagem (WU et al., 2013), 20 mg/kg de venlafaxina por v.o (gavagem) (SONG et al., 2017) e duas soluções de MMI diluído em água adicionadas ao bebedouro nas concentrações de 0,02% e 0,04% (p/v) (WU et al., 2013). Os grupos MMI e SHAM passaram por simulação do procedimento cirúrgico, onde se realizou a incisão cirúrgica, mas não ocorreu a remoção da glândula, procedimento este com o intuito de submeter todos os grupos ao mesmo nível de estresse. Com o mesmo intuito, foi realizado a gavagem diária de salina nos animais SHAM e nos TX e MMI sem reposição hormonal.

## **5.2 Modelo experimental de Hipotireoidismo em ratos**

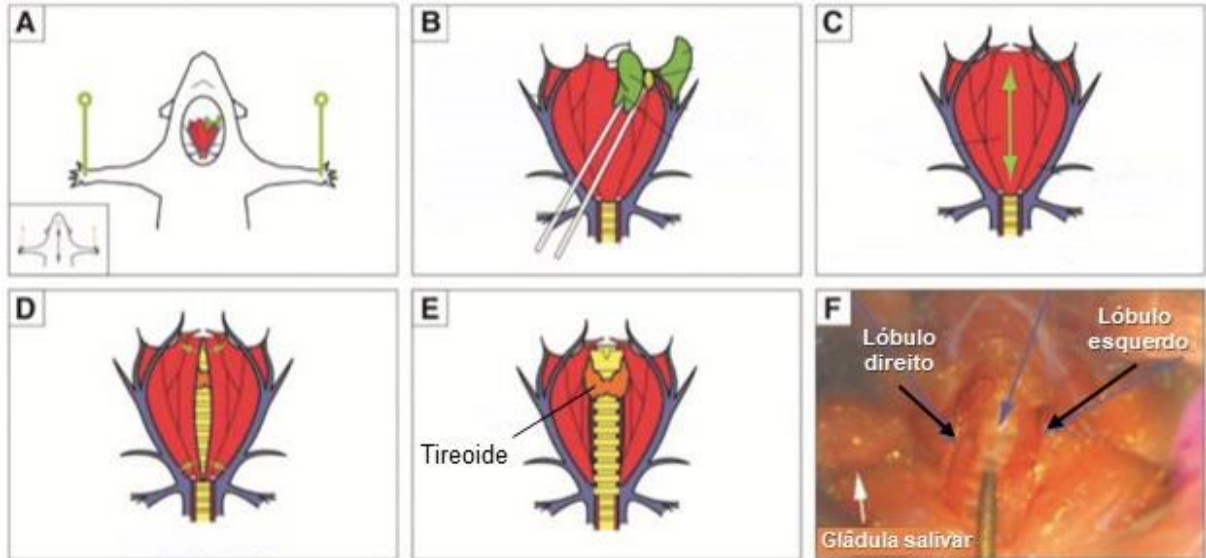
Para indução do modelo experimental de hipotireoidismo em ratos, com idade de 7-8 semanas, foram utilizadas duas técnicas distintas, a tireoidectomia e o uso de MMI.

### **5.2.1 Tireoidectomia**

O procedimento foi realizado conforme reportado por Da Conceição et al. (2016). Em suma, os ratos foram anestesiados com cetamina (90mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), conforme descrito no documento de doses de agentes para ratos disponibilizado pelo biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), e as glândulas tireoidianas retiradas do tubo traqueal. A Figura 2 ilustra as etapas do procedimento. Após a cirurgia, foi realizado o tratamento com pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte (24000 UI/kg intramuscular), analgesia com cetoprofeno (5mg/kg subcutânea) e foram mantidos em caixas individuais de polipropileno por 5 dias, para recuperação pós-cirúrgica. Os ratos tireoidectomizados foram submetidos a tratamento com MMI (0,02% em água) durante 3 semanas, mantendo dieta normal, com o objetivo de acelerar a indução do hipotireoidismo sistêmico. Durante o tratamento foi feito acompanhamento do ganho de peso e

ingestão de líquidos dos animais de três em três dias, e ao final, realizadas dosagens hormonais de T4 livre e TSH.

Figura 2 - Etapas da Tireoidectomia.



Fonte: Adaptado de BIANCO et al. (2014)

Legenda: a) Incisão cirúrgica;

b) isolando glândulas salivares;

c) dissociação dos músculos;

d) libertar a traqueia;

e) dissociação dos músculos laterais;

f) com auxílio de uma pinça deslizar debaixo da traqueia, revelando a glândula tireóidea, realizando sua remoção com o uso de uma tesoura oftálmica.

### 5.2.2 Tratamento com metimazol

Foi realizado o tratamento utilizando MMI diluído na água potável dos ratos na concentração de 0,04% (p/v) por 4 semanas, sendo realizada a troca da solução a cada 3 dias, conforme procedimento adaptado de Wu et al. (2013). Durante o tratamento foi feito acompanhamento do ganho de peso e ingestão de líquidos dos animais de três em três dias, e ao final, realizadas dosagens hormonais de T4 livre e TSH.

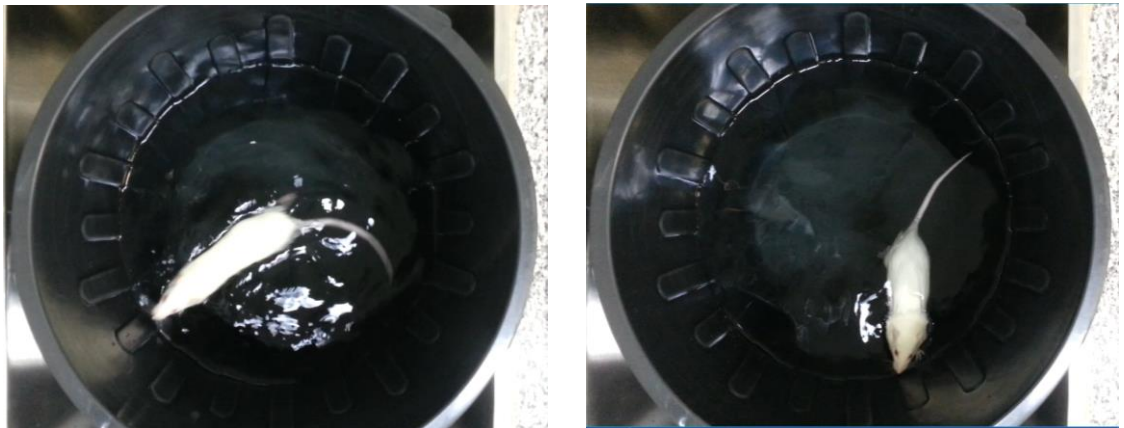
### 5.3 Testes comportamentais para determinação da depressão

Foram realizados em todos os animais em estudo para a avaliação do quadro depressivo, sendo feitos durante a última semana de tratamento de cada grupo.

### 5.3.1 Nado forçado

O teste foi executado, com um animal por vez, no período das 17 às 19h, sendo utilizado um recipiente de 35 cm de diâmetro, com água a 25° C e profundidade de 50 cm, para evitar fuga ou apoio no fundo do cilindro, conforme demonstrado na Figura 3. No dia anterior ao procedimento (24h) os ratos passaram por sessões de treinamento por 15 min. No dia seguinte, o teste foi realizado por 5 min, onde com o auxílio de um tripé e uma câmera foram realizadas as gravações do teste (DA CONCEIÇÃO et al., 2016). A interpretação do teste baseou-se em mobilidade, se o rato apresentar um maior tempo de imobilidade em relação aos animais do grupo controle é característico de comportamento semelhante à depressão. Na Figura 3 pode se visualizar o animal durante o teste.

Figura 3 - Foto durante a realização do teste de nado forçado, demonstrando o recipiente utilizado.



Fonte: Do autor

### 5.3.2 Teste de preferência por sacarose

O teste foi adaptado de Yu et al., (2015); primeiramente os ratos foram habituados a consumir uma solução de sacarose a 2% (p/v) durante 1h por dia por 2 dias. Após este período, os animais foram alojados em caixas individuais onde foi disponibilizada (por 24hr), solução de sacarose a 5% (p/v) e de água potável, para



que o rato escolhesse entre as mesmas. A preferência à sacarose (%) foi calculada de acordo com equação:

$$\frac{\text{Ingestão de sacarose}}{\text{Ingestão de água} + \text{Ingestão de sacarose}} \times 100 = \text{Preferência por sacarose}(\%)$$

Uma baixa preferência por sacarose em comparação ao grupo controle é característico de sintoma de anedonia, perda da capacidade de sentir prazer, sintoma este presente na depressão.

#### 5.4 Teste do Rota-rod

Foi realizado utilizando o equipamento Rota-rod (Insight Ltda, Brasil) com intuito de verificar a presença do sintoma de fraqueza muscular nos animais onde foi feita indução do hipotireoidismo sem a reposição hormonal.

Os animais (n=6 por grupo) foram submetidos à sessão de treinamento em rotação de 5 rpm por 5min no dia anterior ao teste. No dia do teste os mesmos foram manipulados pelo experimentador 2 horas antes do experimento. Em seguida, foram colocados no cilindro e a velocidade de rotação foi mantida de 5 a 35 rpm conforme demonstrado na Figura 4. O tempo para queda dos animais foi computado pelo equipamento e usado para a comparação estatística entre os grupos SHAM e os grupos Tx e MMI sem reposição hormonal.

Figura 4 - Teste Rota rod em execução.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES, 2016.

## **5.5 Dosagens hormonais**

Para a confirmação do hipotireoidismo, foram realizadas dosagens hormonais de T4 livre e TSH dos grupos em estudo, sendo que, após o período de tratamento foi realizado a eutanásia por decapitação dos animais e o sangue foi coletado em tubos sem anticoagulantes, contendo sistema de gel para separação do soro. Depois da coleta, o sangue foi centrifugado a 1811g por 20 min a 4° C para obtenção do soro.

As amostras foram identificadas e encaminhadas à serviço privado de dosagem hormonal, para realização das dosagens por método de quimiluminescência.

## **5.6 Extração de tecidos para determinação da massa tecidual**

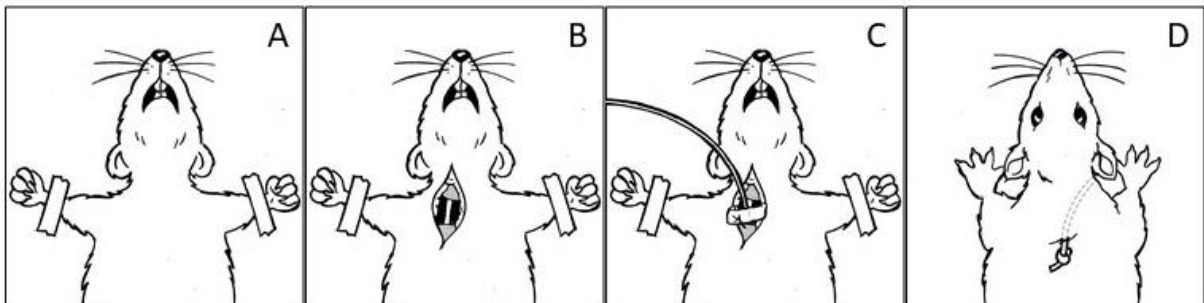
Após a eutanásia e a coleta de sangue dos animais para as dosagens hormonais ou para cinética, foi realizada a coleta de tecidos [hipófise, adeno-hipófise, tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB) perigonadal e a tireoide]. As massas dos tecidos foram determinadas e corrigidas para 100 gramas de massa corporal do animal, com intuito de avaliar o efeito da falta dos HT nos tecidos relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e tecidos alvos dos HT conforme descrito por Bianco et al. (2014).

## **5.7 Protocolo para avaliação farmacocinética da venlafaxina**

As coletas foram feitas segundo a técnica de canulação da veia jugular externa direita, desenvolvida por Harms e Ojeda, (1974), na qual os animais são anestesiados com cetamina (90mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal (UNIFAL-MG, [2016?]), fixados à plataforma, com seu abdômen para cima e braços abertos para facilitar a cirurgia (Figura 5A), e realizada a incisão cirurgia na região da clavícula, onde é possível observar a veia jugular (Figura 5B). Em seguida, a veia foi dissecada

para facilitar o acesso, e com o auxílio de uma agulha foi feita sua perfuração, saindo pelo músculo. Então retirou-se a agulha da extremidade da cânula e com o auxílio de uma pinça movimentou-se a cânula para que ela ficasse dentro da luz da veia e o sangue fluísse por ela. A cânula foi fixada ao músculo (Figura 5C) e transpassada por debaixo da pele até o dorso do animal (Figura 5D). Após a fixação, a cânula foi lavada com solução isotônica contendo heparina na proporção 1:50, com objetivo de evitar obstrução.

Figura 5 - Etapas do procedimento de canulação.



Fonte: Do autor

Legenda: a) fixação do animal;  
 b) Incisão cirúrgica;  
 c) acesso da veia e fixação da cânula no músculo;  
 d) transpasso da cânula até o dorso do animal.

No dia posterior à canulação, foi realizada a administração por gavagem de venlafaxina (20 mg/kg v.o), o volume de 0,3mL de sangue foi coletado em tubos com heparina nos tempos: 0,16; 0,33; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 3,5; 5; 8 e 12h conforme descrito por Song et al. (2017). Foi realizada reposição de volume a cada colheita com salina estéril. Depois da colheita, o sangue foi centrifugado por 20 minutos a 1811g a 4°C, e o plasma separado e armazenado à -70°C, para posterior análise.

## 5.8 Quantificação de proteínas totais

A metodologia foi baseada no método Bradford (BRADFORD, 1976), onde preparou-se uma solução padrão de albumina na concentração 2000mg/mL, e por meio de diluições seriadas obteve-se as concentrações utilizadas para curva de calibração (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,62mg/mL).

Utilizando como amostra a primeira coleta para farmacocinética de cada animal

(coleta de 10min), as mesmas foram diluídas na proporção 1:100 (5µL de amostra + 495µL de água destilada) para se adequar a faixa de concentração da curva de calibração. Após esse processo, foram pipetados 10µL do branco, das soluções de albumina e das amostras diluídas em seus denominados poços na placa de Elisa contendo 96 poços. A quantidade de 300µL do reagente de Bradford foi adicionada em cada poço e após 5 minutos realizou-se a leitura da placa em 595nm.

## 5.9 Metodologia de análise da Venlafaxina em plasma de rato por GC/MS

### 5.9.1 Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas QP2010 Plus, Shimadzu<sup>®</sup>, Japão
- Centrífuga de tubos 80-2B CENTRIBIO<sup>®</sup>, Brasil
- Banho ultrassônico USC-2800a, Unique<sup>®</sup>, Brasil
- Agitador de tubos vertical VIBRAX VXR Basic, IKA<sup>®</sup>, Brasil
- Misturador tipo vórtex MAXI MIX II, Thermolyne<sup>®</sup>, Estados Unidos
- Secadora e concentradora de amostras CentriVap Concentrator, LABCONCO<sup>®</sup>, Estados Unidos
- Balança analítica 410, Kern<sup>®</sup>, Brasil
- pHmetro mPA-210, MS TECNOPON<sup>®</sup>, Brasil
- Micropipeta de volume variável 100-1000 µL, Peguepet<sup>®</sup>, Brasil
- Pipetador de volume ajustável 2-15µL, KACIL<sup>®</sup>, Brasil
- Pipetador de volume ajustável 20-200 µL, KACIL<sup>®</sup>, Brasil
- Tubo de vidro 10 mL com tampa de rosca
- Béquer 100 mL, Qualividros<sup>®</sup>, Brasil
- Ultrafreezer (-80°C) Glacier, Nuaire<sup>®</sup>, Brasil
- Freezer (-20°C) F-21 smile, Prodócimo<sup>®</sup>, Brasil
- Balão volumétrico 5 mL, VIDROLABOR<sup>®</sup>, Brasil

- Balão volumétrico 10 mL, IONGLASS<sup>®</sup>, Brasil
- Balão volumétrico 100 mL, Pyrex<sup>®</sup>, Brasil
- Balão volumétrico 250 mL, Pyrex<sup>®</sup>, Brasil
- Proveta volumétrica 100 mL, DiogoLab<sup>®</sup>, Brasil
- Proveta volumétrica 200 mL, DiogoLab<sup>®</sup>, Brasil
- Pipeta graduada 5 mL, Glasstécnica<sup>®</sup>, Brasil
- Agitador horizontal de tubos MA.139/CFT/UN, Marconi<sup>®</sup>, Brasil
- Agitador magnético Multi Stirrer, Velp Scientifica<sup>®</sup>, Itália

### 5.9.2 Reagentes

- Hexano PA-ACS, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil, lote: 97750
- Acetato de etila PA, PROQUÍMIOS<sup>®</sup>, Brasil, lote: 12/0390
- Acetona UV/HPLC, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil, lote: 86376
- Metanol HPLC, J.T. Baker<sup>®</sup>, Estados Unidos, lote: X22CDO
- Acetonitrila HPLC, J.T. Baker<sup>®</sup>, Estados Unidos, lote: T41C53
- Venlafaxina (teor: 99,9%) padrão secundário adquirido pela farmácia Musgo<sup>®</sup>
- Diazepam cedido pela União Química<sup>®</sup>

### 5.9.3 Preparo de solução

Inicialmente foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL com o padrão de venlafaxina (adquirido pela farmácia Musgo). Por meio de diluição sucessiva em metanol foram preparadas as soluções nas concentrações 200, 400, 800, 1000, 2000, 3000, 4000ng/mL, utilizadas na obtenção dos calibradores da curva analítica (50, 100, 200, 250, 500, 750, 1000ng/mL).

Para o padrão interno (PI) foi pesado 10mg de diazepam (cedido pela União Química) em balão volumétrico de 10mL, e em seguida, feita diluições sucessivas até obter uma solução de 400ng/mL.

#### 5.9.4 Metodologia de análise

Para determinação da venlafaxina baseou-se no método desenvolvido por Song et al., (2017), alterando-se o preparo de amostra, utilizando a técnica de extração líquido-líquido. Em resumo, o volume de 25 $\mu$ L das soluções calibradoras de venlafaxina (200, 400, 800, 1000, 2000, 3000, 4000ng/mL) e 25 $\mu$ L de padrão interno (Diazepam 400ng/mL) foram adicionados em tubo, realizando a secagem por meio da utilização de secadora a vácuo. Posteriormente, foi adicionado 100 $\mu$ L de plasma branco (matriz isenta de analito) e feita a agitação em vórtex por 30 segundos, obtendo as concentrações utilizadas na construção da curva analítica (50, 100, 200, 250, 500, 750, 1000ng/mL de venlafaxina). Em seguida, foram adicionados 4mL da mistura de hexano e acetado de etila na proporção 70:30 (v:v) respectivamente e 200 $\mu$ L de Tampão carbonato de pH=10. Os tubos foram agitados a 1000rpm por 15 min em agitador de tubos vertical e centrifugados a 675 G por 5 min para separação das fases. Uma alíquota de 3 mL foi transferida para um novo tubo, realizando a secagem utilizando-se de secadora a vácuo, em seguida o resíduo foi ressuspendido em 100 $\mu$ L de metanol e transferido para *vials* contendo *inserts*. O volume de 1 $\mu$ L foi injetado no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-MS/MS)

As análises foram realizadas utilizando uma coluna capilar Rtx-5MS (Restek), com dimensões de 30m de comprimento e 0,25mm de espessura. O gás de arraste foi o hélio e a temperatura do injetor ajustada a 280°C. A temperatura inicial do forno de 100°C foi mantida durante 1 minuto, seguida de aumento de 40°C/min até 260°C, mantida por 4 min. A seguir a temperatura aumentou para 300°C a uma razão de 40°C/min, mantida durante 2 min, com tempo total de análise cromatográfica igual a 12 min.

O espectrômetro de massa (MS) foi operado em modo de ionização por impacto de elétrons com a temperatura da fonte em 230°C e a temperatura da interface 250°C. Uma solução padrão de venlafaxina e diazepam foram analisadas separadamente no

modo de varredura total (modo *scan* de 50-500 m/z) para determinação dos íons característicos. Os íons precursores e íons produtos obtidos foram m/z de 277 > 58, 134 e 121, sendo a transição 277 > 58 de maior intensidade para venlafaxina, e para o diazepam m/z de 284 > 192, 154 e 222, com a transição 284 > 192 de maior intensidade. Portanto, após a seleção dos íons produtos o MS foi operado no modo íon seletivo (SIM).

## 5.10 Validação da metodologia analítica

O método foi validado segundo a legislação vigente para métodos bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária: RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012), atestando os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intra e interensaios, exatidão, efeito matriz, efeito residual, limite inferior de detecção, limite inferior de quantificação, seletividade e estabilidades, a fim de garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados.

### 5.10.1 Linearidade

Para construção da curva analítica, foi adicionado 25µL da solução calibradora de venlafaxina em 7 concentrações distintas (200, 400, 800, 1000, 2000, 3000, 4000ng/mL) e 25µL da solução de PI (diazepam 400ng/mL) a 100µL de plasma isento de analito. A amostra foi processada como descrito no item 5.9.4.

### 5.10.2 Precisão e exatidão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados encontrados em uma amostra de mesma concentração, ou seja, determina a capacidade de se obter repetibilidade em um método quando é aplicado diversas vezes. Para este parâmetro

realizou-se a avaliação da precisão intra (realizada no mesmo dia) e intercorridas (realizada em 3 dias diferentes). A avaliação foi feita por meio do controle de qualidade de baixa concentração (CQB – 200ng/mL), controle de qualidade de média concentração (CQM – 500ng/mL) e controle de qualidade de alta concentração (CQA – 750ng/mL) em 6 repetições. O resultado foi expresso por meio do cálculo do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

$$\text{CV ou DPR(\%)} = (\text{desvio padrão} \times 100) / \text{média}$$

A exatidão verifica a capacidade de os resultados encontrados no método utilizado serem semelhantes aos valores aceitos como reais, sendo realizada da mesma forma que descrito para precisão. Os resultados foram expressos pelo cálculo do erro padrão relativo (EPR).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Para precisão são aceitos valores de DPR em até 20% somente para o LIQ e até 15% para os demais calibradores. O mesmo vale em relação aos valores de EPR para exatidão (ANVISA, 2012).

#### 5.10.3 Limite inferior de quantificação

O LIQ expressa a menor concentração que o método é capaz de detectar e quantificar com precisão e exatidão, sendo assim com valores inferiores à 20% para DPR e EPR. Este parâmetro foi realizado por meio de 6 replicatas (ANVISA, 2012).

#### 5.10.4 Limite detecção

Determina a menor concentração do analito de interesse que pode ser



detectada, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2012).

Foi determinado por meio da fórmula:

$$LD = (DPa \times 3,3)/IC$$

No qual,

LD = Limite de detecção

DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica

IC = inclinação da curva analítica

#### 5.10.5 Efeito Matriz

Este parâmetro foi feito utilizando-se oito matrizes biológicas distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. As matrizes foram processadas e posteriormente adicionou-se a solução padrão de PI e analito nas mesmas concentrações do controle de qualidade baixo (CQB= 200ng/mL em plasma) e controle de qualidade alto (CQA= 750ng/mL em plasma), realizando em triplicata para cada controle de qualidade.

A ausência de efeito matriz é comprovada por meio da fórmula demonstrada abaixo, onde, resultados de coeficiente de variação (CV) para o fator de matriz normalizado (FMN) inferiores a 15% são aceitos (ANVISA, 2012).

$$FMN = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

#### 5.10.6 Efeito Residual

O efeito residual (*carryover*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores às quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco ou PI. Para essa análise, realizou-se três injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ) do analito (ANVISA, 2012).

#### 5.10.7 Seletividade

Se define como a capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse sem a interferência de componentes que possam estar presentes na matriz. Este parâmetro foi realizado através da análise em triplicata de um *pool* de plasma de 6 ratos.

#### 5.10.8 Estabilidade

A estabilidade foi testada com o objetivo de verificar se o analito mantinha suas concentrações constantes frente às condições de preparo, análise e estocagem das amostras. Foi realizada a estabilidade de pós processamento e de curta duração, sendo aceito valores de inferiores a 15% (ANVISA, 2012).

##### 5.10.8.1 Estabilidade de curta duração

Amostras de plasma fortificadas com padrões referentes aos controles de qualidade CQB e CQA (200 e 750ng/mL respectivamente), realizadas em quadruplicata, foram deixadas em repouso nas condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) e durante todo o processo de preparo das amostras (6h). Posteriormente, submetidas ao preparo de amostra e análise conforme

descrito no item 5.9.4, comparando os resultados obtidos com amostras recém-preparadas (ANVISA, 2012).

#### 5.10.8.2 Estabilidade de pós processamento

Amostras fortificadas com padrões nas concentrações de 200 e 750ng/mL (CQB e CQA, respectivamente), em quadruplicata, foram submetidas ao preparo de amostras descrito no item 5.9.4. Em seguida, foram colocadas como as últimas análises a serem realizadas pelo equipamento.

### 5.11 Análise Farmacocinética

Após obtenção das concentrações plasmáticas de venlafaxina nas amostras coletadas, foi feita a modelagem farmacocinética por meio da utilização do software WinNonlin® versão 4.0 (PharsightCorp, Mountain View, Califórnia, EUA), onde o modelo mais adequado aos dados obtidos foi o modelo monocompartimental, obtendo os parâmetros: área sob a curva (AUC), *clearance*, meia vida ( $t_{1/2}$ ), concentração máxima ( $C_{máx}$ ) e o tempo para alcançar a concentração máxima no plasma ( $t_{máx}$ ).

### 5.12 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Instat® (GraphPad Software, CA, USA) versão 6.0. Para a avaliação do efeito biológico e os testes comportamentais, a relação entre os grupos foi realizada por Análise de Variância de duas vias, seguida de teste de Tukey para múltiplas comparações. Todos estes dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

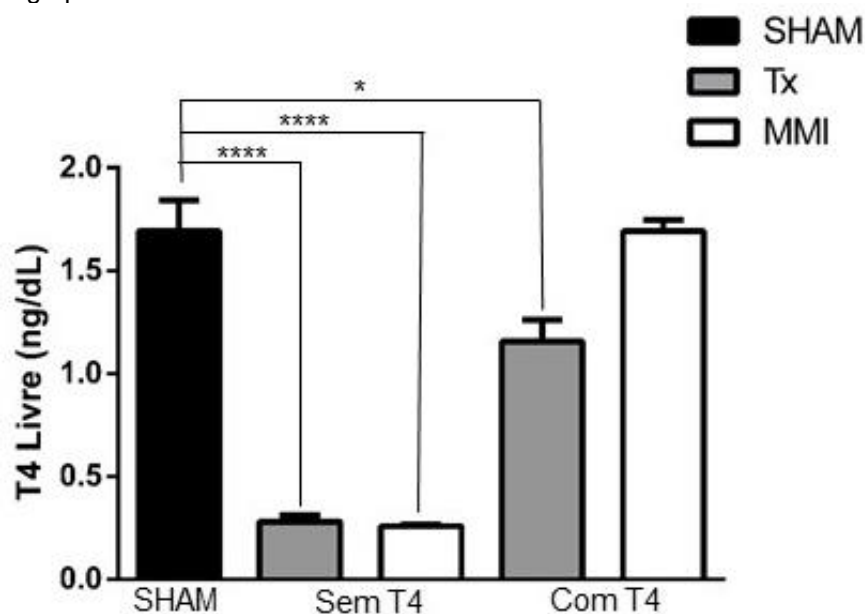
Para comparação dos parâmetros farmacocinéticos entre os grupos controle, com reposição e sem reposição hormonal, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado, expressando os resultados por meio da mediana e do intervalo de confiança 95% (IC 95%). Considerando valores de  $p < 0,05$  como significativos.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização do modelo de hipotireoidismo

Por meio das dosagens hormonais de T4 livre dos animais em estudo, demonstrada na Figura 6, os níveis de T4 nos grupos Tx e MMI sem reposição hormonal se mostraram significativamente menores em relação ao grupo SHAM ( $0,28 \pm 0,03$  e  $0,26 \text{ ng/dL}$  vs.  $1,69 \pm 0,15 \text{ ng/dL}$ ;  $p < 0,0001$ ) e aos grupos Tx e MMI com reposição de T4 ( $1,16 \pm 0,10$  e  $1,69 \pm 0,05 \text{ ng/dL}$ ). Não houve diferença significativa entre o grupo MMI com reposição e o SHAM, porém um resultado contrário foi demonstrado no grupo Tx com reposição, apresentando um valor médio significativamente abaixo do controle ( $1,15 \pm 0,10$  vs.  $1,69 \pm 0,15 \text{ ng/dL}$ ;  $p < 0,05$ ).

Figura 6 - Dosagens de T4 livre no plasma dos animais em estudo. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; n =6/grupo.



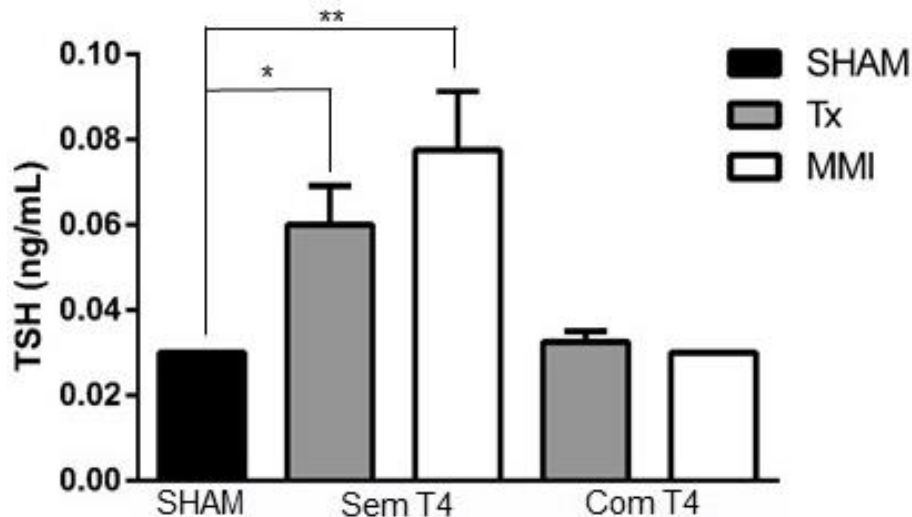
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu\text{g/kg/dia}$  V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu\text{g/kg/dia}$  V.O).

Resultados complementares aos encontrados nas dosagens de T4 livre foram obtidos nas dosagens de TSH dos grupos em estudo, exibidos na Figura 7, que mostra que os níveis de TSH se encontraram elevados para os grupos Tx e MMI sem

reposição ( $0,06$  e  $0,08 \pm 0,01$  ng/mL) frente ao grupo SHAM ( $0,03$  ng/mL;  $p < 0,05$  para o Tx e  $p < 0,01$  para MMI) e aos grupos Tx e MMI com reposição ( $0,03$  e  $0,03$  ng/mL).

Figura 7 - Dosagens de TSH no plasma dos animais em estudo. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 4$ /grupo.



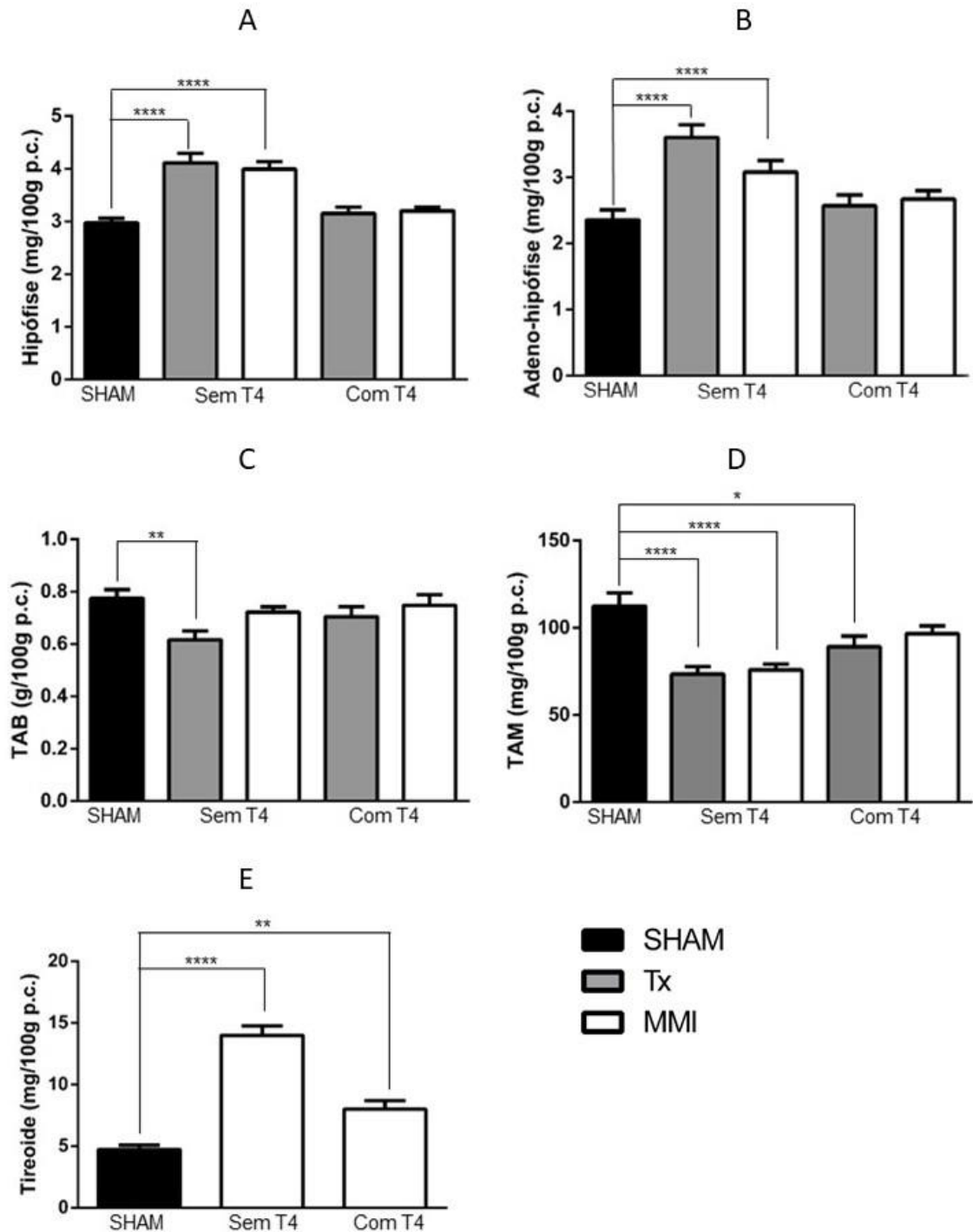
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol ( $0,04\%$  p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol ( $0,04\%$  p/v) e reposição hormonal de tiroxina ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  V.O).

Em relação às análises das massas dos tecidos extraídos, é possível notar que nos animais dos grupos Tx e MMI sem reposição hormonal, a falta dos HT pode ser associada a um aumento de massa da hipófise ( $4,11 \pm 0,18$  e  $3,99 \pm 0,14$  mg/100g p.c. vs.  $2,97 \pm 0,08$  mg/100g p.c.;  $p < 0,0001$  Tx e MMI; Figura 8A) e da adeno-hipófise ( $3,40 \pm 0,16$  e  $3,08 \pm 0,17$  mg/100g p.c. vs.  $2,18 \pm 0,10$  mg/100g p.c.;  $p < 0,0001$  Tx e MMI; Figura 8B) em relação ao grupo SHAM. Já os grupos Tx e MMI que fizeram a reposição hormonal, os resultados para variação de massa nos diferentes tecidos não apresentaram diferenças em comparação ao SHAM em relação a hipófise (Figura 8A) e adeno-hipófise (Figura 8B). O mesmo foi notado para massa da tireoide (Figura 8E), onde o grupo MMI sem reposição hormonal obteve valores superiores ao SHAM ( $14,00 \pm 0,75$  mg/100g p.c. vs.  $4,73 \pm 0,34$  mg/100g p.c.;  $p < 0,0001$ ), entretanto, para a tireoide o grupo com reposição hormonal obteve valores diferentes estatisticamente comparando-se com o grupo SHAM ( $7,99 \pm 0,69$  mg/100g p.c. vs.  $4,73 \pm 0,34$  mg/100g p.c.;  $p < 0,01$ ).

Outro resultado relevante é em relação a massa do TAM (Figura 8D), uma vez que os grupos Tx e MMI que não realizaram reposição hormonal apresentaram uma massa menor que o grupo SHAM ( $73,39 \pm 4,42$  e  $75,89 \pm 3,33$  mg/100g p.c. vs.  $112,59 \pm 7,51$  mg/100g p.c.;  $p < 0,0001$  para Tx e  $p < 0,001$  para MMI). Por outro lado, o grupo Tx com reposição também se apresentou com massa reduzida em comparação ao grupo SHAM ( $89,17 \pm 6,18$  mg/100g p.c vs.  $112,59 \pm 7,51$  mg/100g p.c.;  $p < 0,05$ ). Já para o TAB perigonadal somente o grupo Tx sem reposição apresentou resultados diferentes em relação aos obtidos no grupo SHAM ( $0,61 \pm 0,03$  g/100g p.c vs.  $0,77 \pm 0,03$  g/100g p.c;  $p < 0,01$ ) como demonstrados na Figura 8C.

Figura 8 - Relação das massas dos tecidos coletados Hipófise (A), Adeno-Hipófise (B), TAB (C), TAM (D) e Tireoide (E). Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Tx (n = 14); MMI (n = 13); SHAM (n = 14).



Fonte: Do autor

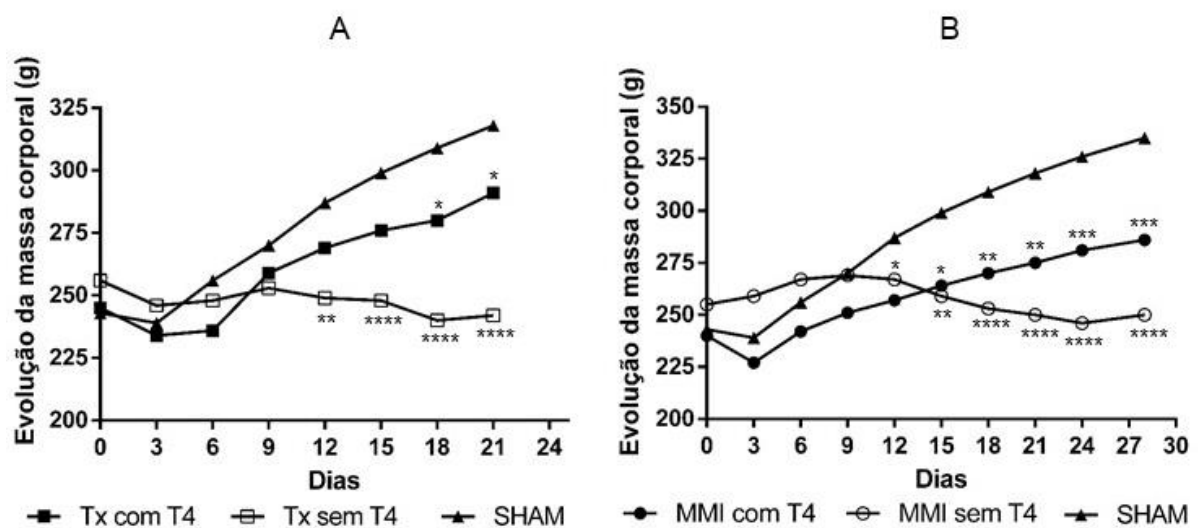
Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O).



Conforme pode ser visualizado na Figura 9, a evolução de massa corporal foi outro parâmetro que se comportou bem diferente nos grupos avaliados (SHAM, Tx com T4, Tx sem T4, MMI com T4 e MMI sem T4). Por volta do 12º dia para o grupo Tx sem reposição hormonal (Figura 9A) houve uma evolução significativamente menor em relação ao SHAM ( $248,86 \pm 5,11\text{g}$  vs.  $286,83 \pm 8,89\text{g}$ ;  $p < 0,01$ ), diferença essa que se mostrou crescente até o último dia de tratamento ( $241,53 \pm 4,74\text{g}$  vs.  $318,16 \pm 8,78\text{g}$ ;  $p < 0,0001$ ), enquanto que para o grupo Tx com reposição hormonal só houve diferença por volta do 18º dia ( $279,58 \pm 7,64\text{g}$  vs.  $308,58 \pm 9,55\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ), permanecendo-se a mesma até o 21º dia ( $290,66 \pm 7,39\text{g}$  vs.  $318,16 \pm 8,78\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ) em relação ao SHAM.

O mesmo padrão de resposta foi observado no grupo MMI sem reposição (Figura 9B), o qual apresentou por volta do 12º dia uma redução significativa no ganho de massa corporal em relação ao SHAM ( $266,69 \pm 5,67\text{g}$  vs.  $286,83 \pm 8,89\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ), redução esta que também se demonstrou crescente até o último dia de tratamento ( $250,15 \pm 5,64\text{g}$  vs.  $335,00 \pm 10,38\text{g}$ ;  $p < 0,0001$ ). Por outro lado, o grupo MMI com reposição hormonal não acompanhou a evolução de massa observado no SHAM, sendo significativo a partir do 15º dia ( $264,30 \pm 9,24\text{g}$  vs.  $299,33 \pm 9,21\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ), demonstrando crescimento ao decorrer do tratamento até o último dia ( $286,00 \pm 8,63\text{g}$  vs.  $335,00 \pm 10,38\text{g}$ ;  $p < 0,001$ ).

Figura 9 - Evolução de massa corporal dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento. Grupo Tx em relação ao SHAM (A), Grupo MMI em relação ao SHAM (B). Resultados expressos em média. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ;  $n = 14/\text{grupo}$ .

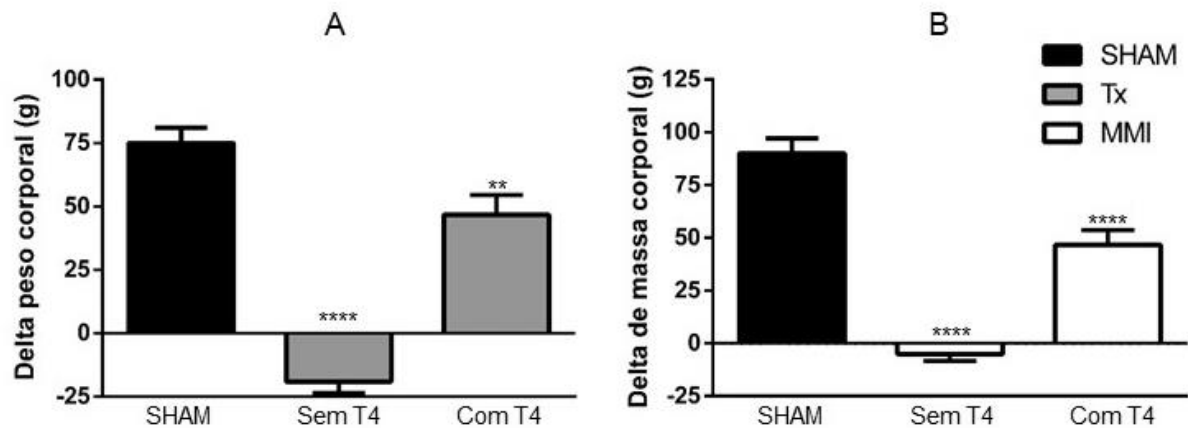


Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina ( $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol ( $0,04\%$  p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol ( $0,04\%$  p/v) e reposição hormonal de tiroxina ( $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  V.O).

Com o delta de massa corporal dos grupos em estudo, ilustrado na Figura 10, é possível observar valores condizentes com a evolução da massa corporal, onde os grupos sem reposição hormonal apresentaram valores baixos, Tx sem reposição (-19,06±4,66g vs. 75,00±5,94g;  $p < 0,0001$ ; Figura 10A) e MMI sem reposição (-5,09±3,27g vs. 90,17±7,01g;  $p < 0,0001$ ; Figura 10B), frente ao grupo SHAM. Em contrapartida, nos grupos com reposição hormonal Tx (46,66±7,88g vs. 75,00±5,94g;  $p < 0,01$ ; Figura 10A) e MMI (46,65±6,98g vs. 90,17±7,01g;  $p < 0,0001$ ; Figura 10B), foi constatado uma diferença em relação ao delta de massa corporal do grupo SHAM.

Figura 10 - Delta de massa corporal dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento. Grupo Tx em relação ao SHAM (A), Grupo MMI em relação ao SHAM (B). Resultados expressos em média ± EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (n = 14/grupo).

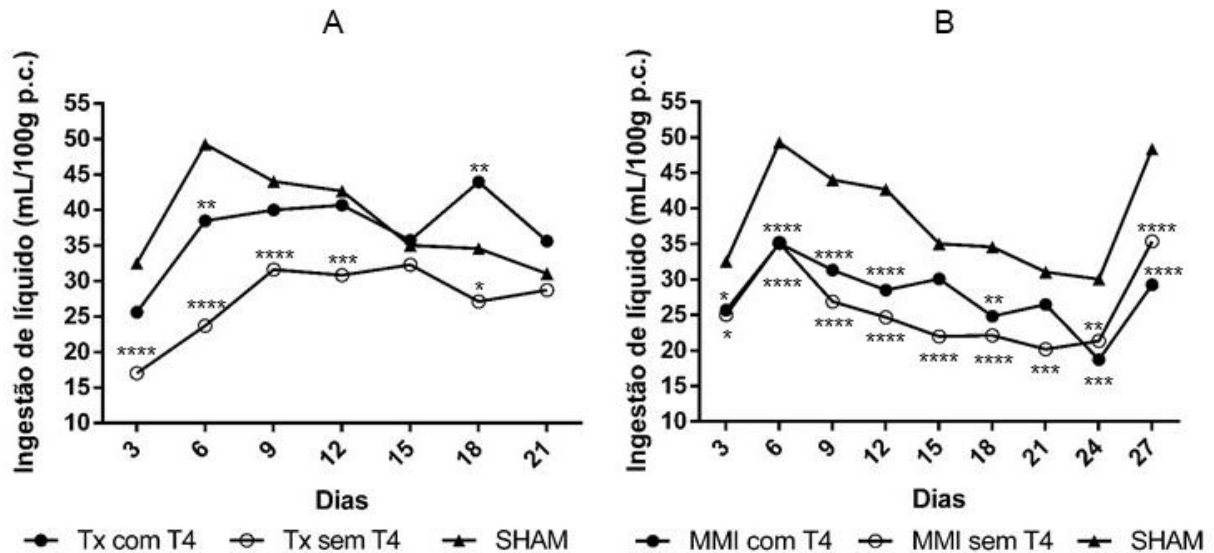


Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20µg/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20µg/kg/dia V.O).

A ingestão de líquidos ilustrada na Figura 11 foi outra medida que se demonstrou diferente em relação ao grupo controle, apresentando resultados variáveis durante todo o período de tratamento para ambos os grupos Tx e MMI, com e sem reposição hormonal.

Figura 11 - Ingestão de líquido dos grupos em estudo referente ao tempo de tratamento. Grupo Tx em relação ao SHAM (A), Grupo MMI em relação ao SHAM (B). Resultados expressos em média. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (n = 6/grupo).



Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O).

## 6.2 Testes comportamentais para avaliação da depressão

### 6.2.1 Nado forçado

A Tabela 2 traz os resultados expressos com a média do tempo de imobilização no nado dos animais, em relação aos seus grupos, no período de 5 minutos do teste.

Tabela 2 - Relação entre os grupos e o tempo de imobilização em segundos no nado forçado.

|                                  | Tx               |                  |                   | MMI               |                        |
|----------------------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
|                                  | SHAM             | Com T4           | Sem T4            | Com T4            | Sem T4                 |
| <b>Tempo de imobilização (s)</b> | 86,88 $\pm$ 6,86 | 98,10 $\pm$ 8,54 | 108,89 $\pm$ 6,03 | 99,18 $\pm$ 10,15 | 153,61 $\pm$ 10,70**** |

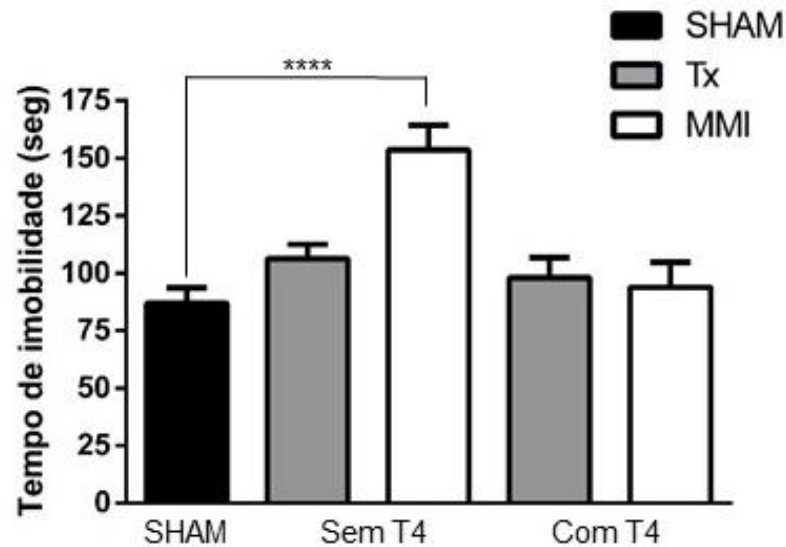
Fonte: Do autor

Legenda: \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo SHAM, s – segundos.

Os resultados foram expressos na Figura 12, na qual é possível observar que o grupo MMI sem reposição hormonal apresentou um maior tempo de imobilidade

frente aos grupos SHAM ( $p < 0,001$ ), enquanto que não houve nenhuma diferença entre os demais grupos.

Figura 12 - Tempo de imobilização no teste de nado forçado em relação aos grupos em estudo. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \*\*\* $p < 0,001$ ; Tx (n = 18); MMI (n = 17); SHAM (n = 18).



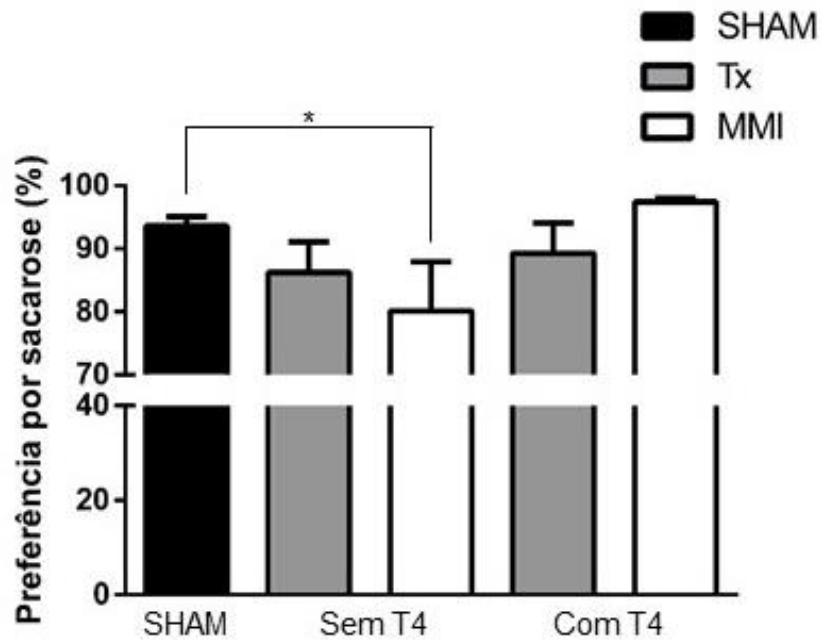
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O).

### 6.2.2 Teste de preferência por sacarose

Com base na Figura 13, nota-se que o grupo MMI sem reposição hormonal apresentou uma preferência por sacarose diminuída em comparação ao grupo SHAM (80,13 $\pm$ 7,77% vs. 94,83 $\pm$ 0,86%;  $p < 0,05$ ). Para os demais grupos não se foi demonstrado nenhuma diferença significativa.

Figura 13 - Teste de preferência por sacarose. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por Two-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; Tx (n = 16); MMI (n = 16); SHAM (n = 15).



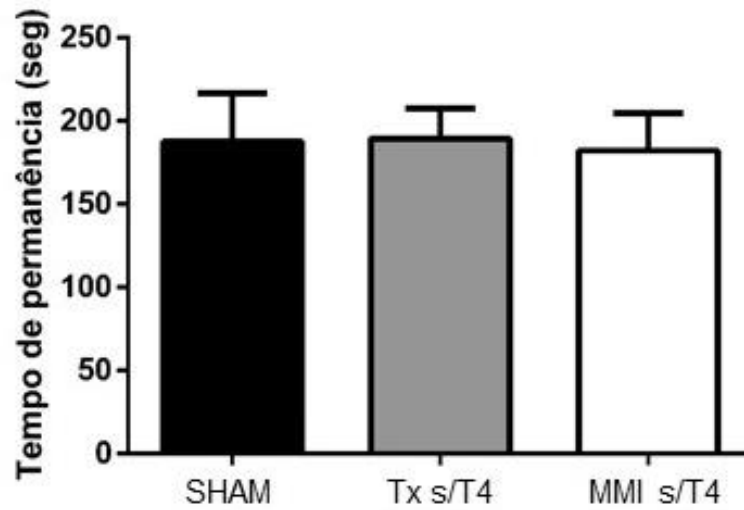
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O).

### 6.3 Rota rod

Os resultados obtidos no teste encontram-se demonstrados na figura 14, na qual é possível observar que não há diferença entre o tempo de permanência em relação aos grupos testados.

Figura 14 - Teste de Rota rod. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por one-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey (n=6/grupo).



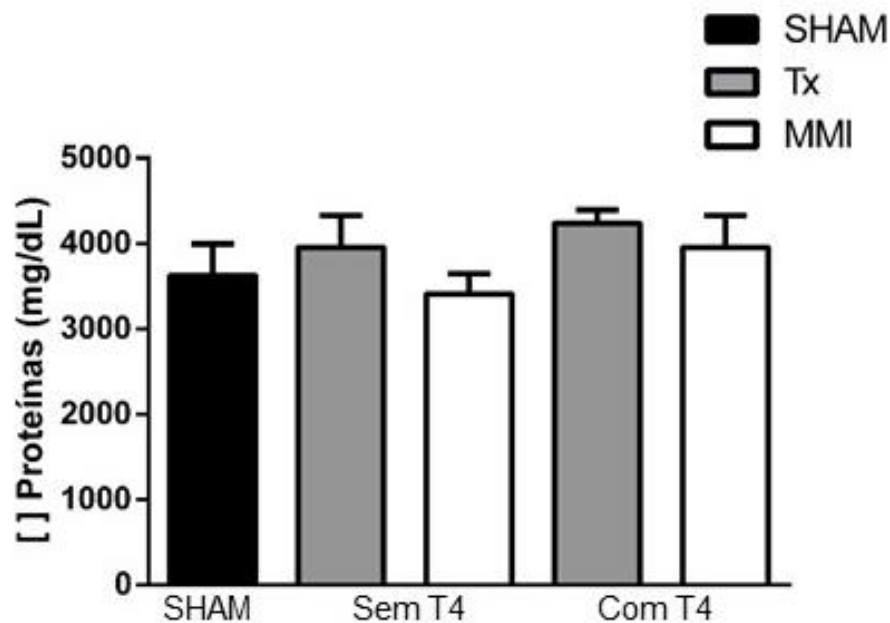
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4.

#### 6.4 Quantificação de proteína totais

Os resultados presentes na Figura 15 apresentam concentrações homogêneas de proteínas para os grupos em estudo, eliminando possíveis alterações em relação a quantidade de proteína plasmática.

Figura 15 - Resultado da quantificação de proteína nas amostras utilizadas para farmacocinética. Resultados expressos em média  $\pm$  EPM. Análise por one-way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. (n= 8/grupo).



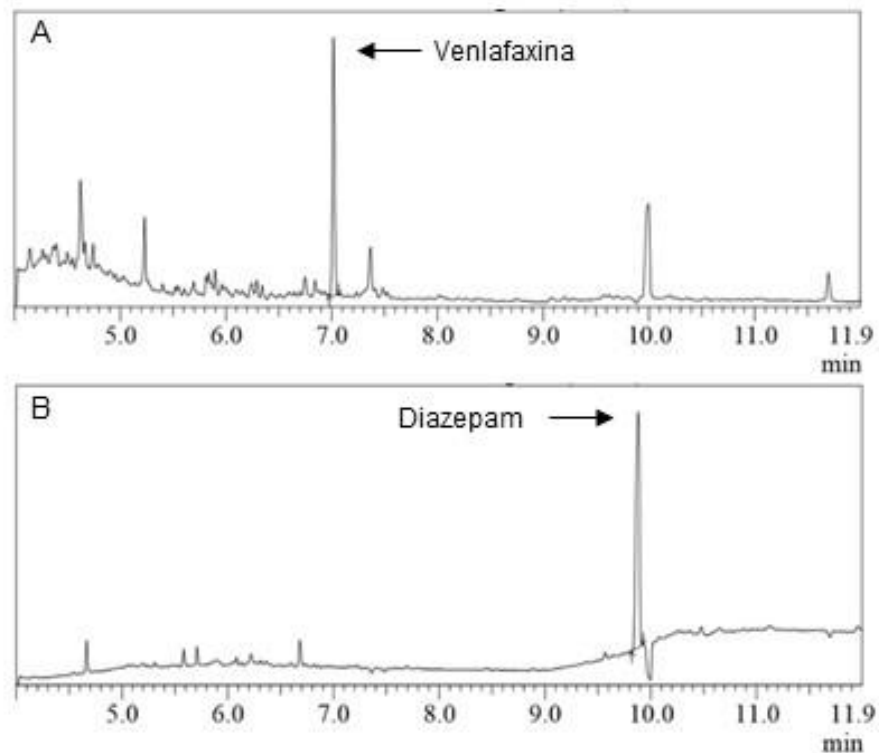
Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx sem T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; Tx com T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O); MMI sem T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4; MMI com T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20 $\mu$ g/kg/dia V.O).

## 6.5 Metodologia de análise da Venlafaxina em plasma de rato por GC/MS

A análise da venlafaxina em plasma de ratos foi realizada após extração líquido-líquido utilizando como solvente extrator a mistura de hexano e acetato de etila na proporção 70:30 respectivamente. A identificação e quantificação foi obtida por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando hélio como gás de arraste e coluna com fase estacionária de fenilmetilpolisiloxano para separação. A Figura 16 traz os cromatogramas obtidos das substâncias analisadas.

Figura 16 - Cromatogramas das substâncias analisadas em modo SIM. Íons produtos monitorados m/z de 58 para venlafaxina e m/z de 192 para diazepam. Venlafaxina 750ng/mL (A) e Diazepam 80ng/mL (B).



Fonte: Do Autor

## 6.6 Validação da metodologia analítica

Os parâmetros testados na validação foram realizados conforme legislação vigente para métodos bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária: RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012), e os resultados estão descritos a seguir.

### 6.6.1 Linearidade

De acordo com a RDC 27/2012, alguns critérios devem ser considerados para análise e aceitação dos pontos da curva analítica, a menor concentração nominal deve ter desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não devem ter desvio



superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração estejam adequados ao acima disposto, e, que no mínimo seis padrões de concentrações distintas sejam utilizados. O LIQ e o limite superior de quantificação (LSQ) também devem atender às exigências anteriores. A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, no intervalo de 50 a 1000 ng/mL de venlafaxina em plasma.

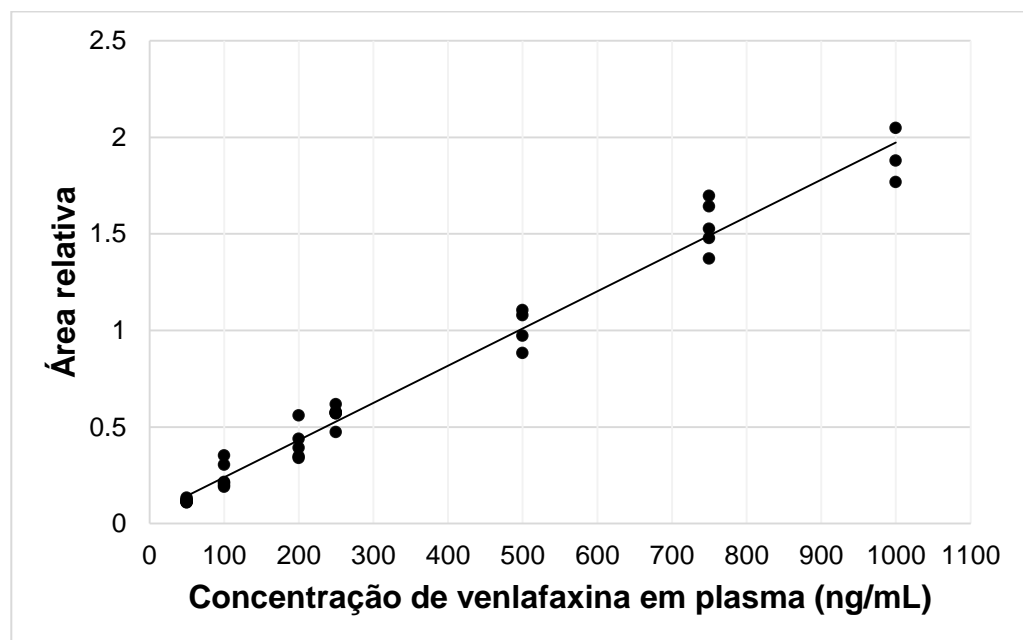
Os resultados obtidos através da curva analítica estão demonstrados na Tabela 3 e na Figura 17, na qual foram feitas 6 réplicas para cada ponto. O coeficiente de correlação foi  $>0,99$  e o coeficiente angular diferente de 0, sendo assim, foi possível caracterizar comportamento linear para a faixa de trabalho escolhida (50 a 1000ng/mL).

Tabela 3 - Parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de venlafaxina em plasma de ratos por CG/MS na faixa de concentração de 50 a 1000 ng/mL de plasma.

| Parâmetro                            | Valor obtido |
|--------------------------------------|--------------|
| Coeficiente angular (a)              | 0,0019       |
| Coeficiente linear (b)               | 0,0463       |
| Coeficiente de correlação linear (r) | 0,9903       |

Fonte: Do autor

Figura 17 - Curva analítica de venlafaxina em plasma.



Fonte: Do autor

### 6.6.2 Precisão e exatidão

Os valores de precisão e exatidão intra e intercorridas estão expressos na Tabela 4. Os valores estão dentro do aceitável para o LIQ (<20% de variação) e para os demais pontos (<15% de variação), conforme a RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012). Sendo assim o método se mostrou preciso e com exatidão para o analito de interesse.

Tabela 4 - Precisão e exatidão intra-dias e interdias.

|                                   |                 | <b>CQB</b> | <b>CQM</b> | <b>CQA</b> |
|-----------------------------------|-----------------|------------|------------|------------|
| <b>Intra-dias</b><br><b>(n=6)</b> | <b>Precisão</b> |            |            |            |
|                                   | (CV%)           | 13.52      | 10.57      | 8.64       |
|                                   | <b>Exatidão</b> |            |            |            |
|                                   | (EPR%)          | -10.84     | 2.04       | 5.40       |
| <b>Interdias</b><br><b>(n=3)</b>  | <b>Precisão</b> |            |            |            |
|                                   | (CV%)           | 9.76       | 10.53      | 6.24       |
|                                   | <b>Exatidão</b> |            |            |            |
|                                   | (EPR%)          | -13.59     | -5.10      | 4.36       |

Fonte: Do autor

Legenda: CV% = coeficiente de variação [(SD/média)x100]

EPR% = [(C<sub>obtida</sub> - C<sub>nominal</sub>)/C<sub>nominal</sub>] $\times$ 100

### 6.6.3 Limite inferior de quantificação

O LIQ para o método desenvolvido foi de 50ng/mL, apresentando CV e EPR inferiores a 20%, resultados demonstrados na Tabela 5, os quais estão dentro dos requeridos pela RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012).

Tabela 5 - Limite inferior de quantificação para venlafaxina.

|                             |                           | LIQ<br>(50ng/mL) |
|-----------------------------|---------------------------|------------------|
| <b>Intra-dias<br/>(n=6)</b> | <b>Precisão</b><br>(CV%)  | 10.49            |
|                             | <b>Exatidão</b><br>(EPR%) | -18.66           |
| <b>Interdias<br/>(n=3)</b>  | <b>Precisão</b><br>(CV%)  | 15.40            |
|                             | <b>Exatidão</b><br>(EPR%) | -11.62           |

Fonte: Do autor

Legenda: CV% = coeficiente de variação [(SD/média)x100]

EPR% = [(C<sub>obtida</sub> - C<sub>nominal</sub>)/C<sub>nominal</sub>] $\times$ 100

#### 6.6.4 Limite de detecção

O LD foi calculado por meio da fórmula descrita no item 5.10.4, e o resultado obtido foi de 31,62ng/mL, valor este que atende as necessidades do método.

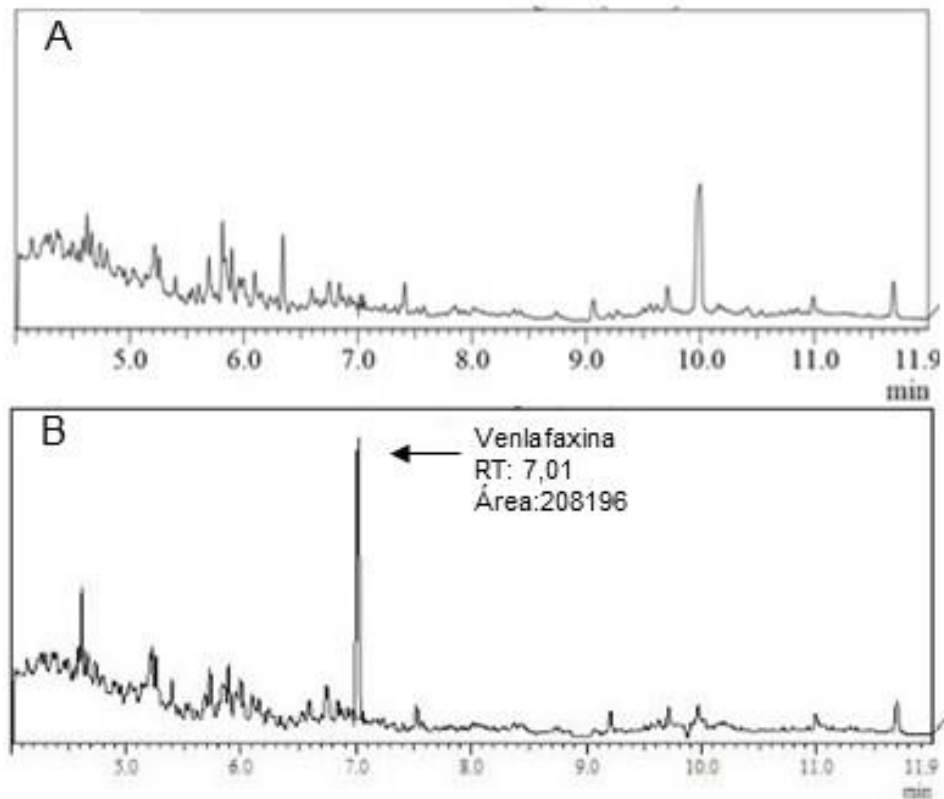
#### 6.6.5 Efeito Matriz

De acordo com os valores de CV obtidos para o efeito matriz, CQB= 7,08% e CQA= 3,13% o método se demonstrou dentro dos limites aceitáveis pela RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012), que são de até 15%. Comprovando a ausência de efeito matriz para o método.

#### 6.6.6 Efeito Residual

Como observado na Figura 18, não houve efeito residual para a análise de venlafaxina em plasma.

Figura 18 - Cromatograma do efeito residual. Injeção do branco após análise do limite superior de quantificação (A) e cromatograma do limite superior de quantificação da venlafaxina (1000ng/mL) (B).

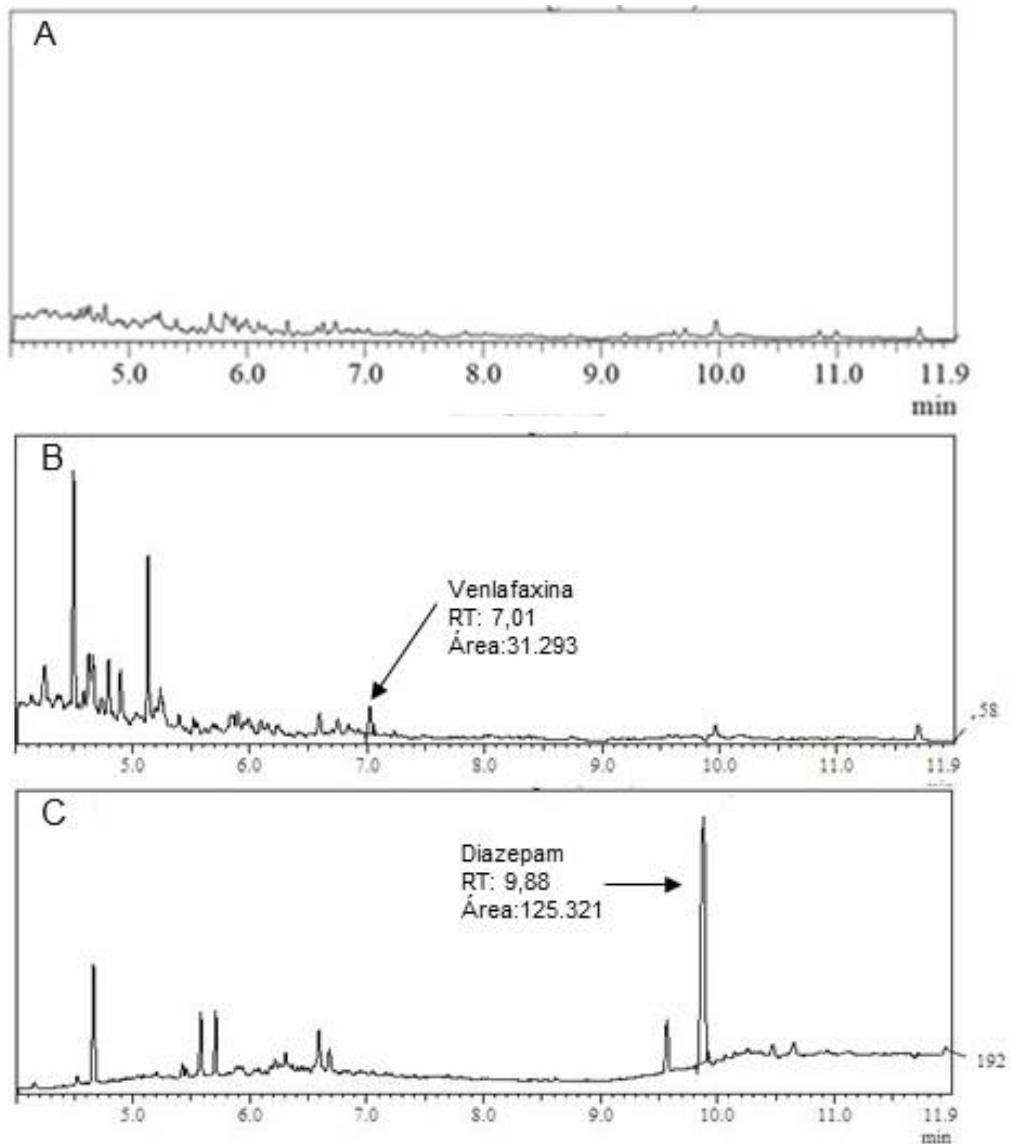


Fonte: Do autor

#### 6.6.7 Seletividade

Os picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito foram inferiores a 20% da resposta da venlafaxina e a 5% na resposta do diazepam nas amostras do LIQ, como ilustrado na Figura 19.

Figura 19 - Cromatograma para seletividade. Pool de plasma branco (A), cromatograma do LIQ (50ng/mL) da venlafaxina (B) e cromatograma do LIQ (50ng/mL) referente ao diazepam (C).



Fonte: Do autor

### 6.6.8 Estabilidade

Os resultados referentes aos estudos de estabilidade estão demonstrados a seguir.

#### 6.6.8.1 Estabilidade de curta duração

Os dados obtidos estão presentes na Tabela 6, e estão dentro do desejado (CV

inferior a 15%).

Tabela 6 - Dados referentes ao teste de estabilidade de curta duração.

| <b>Amostra</b>       | <b>CQB</b> | <b>CQB CD</b> | <b>CQA</b> | <b>CQA CD</b> |
|----------------------|------------|---------------|------------|---------------|
| <b>Média (ng/mL)</b> | 178,31     | 193,41        | 790,55     | 734,21        |
| <b>CV(%)</b>         | 13,52      | 3,04          | 8,64       | 5,05          |

Fonte: Do autor

Legenda: CV% = coeficiente de variação  $[(SD/média) \times 100]$

#### 6.6.8.2 Estabilidade de pós processamento

As amostras se demonstraram estáveis atendendo o requisito de CV inferior a 15% para o CQB e CQA. Os resultados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados referentes ao teste de estabilidade de pós processamento.

| <b>Amostra</b>       | <b>CQB</b> | <b>CQB PP</b> | <b>CQA</b> | <b>CQA PP</b> |
|----------------------|------------|---------------|------------|---------------|
| <b>Média (ng/mL)</b> | 178,31     | 179,38        | 790,55     | 812,38        |
| <b>CV(%)</b>         | 13,52      | 13,49         | 8,64       | 7,08          |

Fonte: Do autor

Legenda: CV% = coeficiente de variação  $[(SD/média) \times 100]$

### 6.7 Análise Farmacocinética

Após as coletas realizadas conforme o item 5.7, o plasma foi processado conforme o método descrito no item 5.9.4. Os resultados das quantificações foram analisados no software WinNonlin® versão 4.0 (PharsightCorp, Mountain View, Califórnia, EUA). A Tabela 8 traz os parâmetros obtidos: área sob a curva (AUC), *clearance*, meia vida ( $t_{1/2}$ ),  $C_{máx}$  e  $t_{máx}$  dos grupos em estudo.

O modelo que melhor se adequou para a análise da venlafaxina foi o modelo monocompartimental, cujo a relação da concentração vs. tempo está ilustrada na Figura 20.

Tabela 8 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos para venlafaxina administrada por via oral em ratos (dose: 20mg/kg). Dados expressos como mediana e intervalo de confiança (IC).

| Parâmetros                       | SHAM                        | Tx c/T4                     | Tx s/t4                               | MMI c/T4                    | MMI s/T4                    |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>AUC (ng.h/mL)</b>             | 1037,5<br>(697,8 – 1709,9)  | 1644,7<br>(901,32 – 2443,3) | 4403,7** a ††<br>(3319,1 – 6113,2)    | 1457,0<br>(775,1 – 2216,0)  | 1106,6<br>(833,5 – 1384,2)  |
| <b>t ½ (h)</b>                   | 1,29<br>(0,94 – 1,94)       | 2,13<br>(1,60 – 3,15)       | 2,95* †<br>(2,06 – 4,57)              | 2,62<br>(1,76 – 3,55)       | 1,15<br>(0,33 – 2,58)       |
| <b>CL<sub>T/F</sub> (L/h/kg)</b> | 19,765<br>(12,392 – 28,744) | 15,037<br>(9,406 – 19,065)  | 4,237** ††<br>(3,340 – 5,851)         | 13,358<br>(7,214 – 29,963)  | 17,657<br>(10,162 – 26,367) |
| <b>t<sub>máx</sub> (h)</b>       | 0,45<br>(0,29 – 0,67)       | 0,35<br>(0,24 – 0,50)       | 0,35<br>(0,22 – 0,52)                 | 0,49<br>(0,24 – 0,82)       | 0,45<br>(0,33 – 0,64)       |
| <b>C<sub>máx</sub> (ng/mL)</b>   | 432,23<br>(324,12 – 572,90) | 417,63<br>(301,53 – 574,43) | 880,35* ° aaa †<br>(759,29 – 1155,40) | 291,77<br>(219,16 – 372,08) | 455,78<br>(314,20 – 605,56) |

Fonte: Do autor

Legenda: AUC: área sobre a curva;

t½: meia-vida;

CL<sub>T/F</sub>: clearance total aparente

t<sub>máx</sub>: Tempo para alcançar a concentração máxima no plasma;

C<sub>máx</sub>: concentração máxima.

Teste de Kruskal-wallis:

\* p<0,05 em comparação ao SHAM

\*\* p<0,01 em comparação ao SHAM

° p<0,05 em comparação ao Tx c/T4

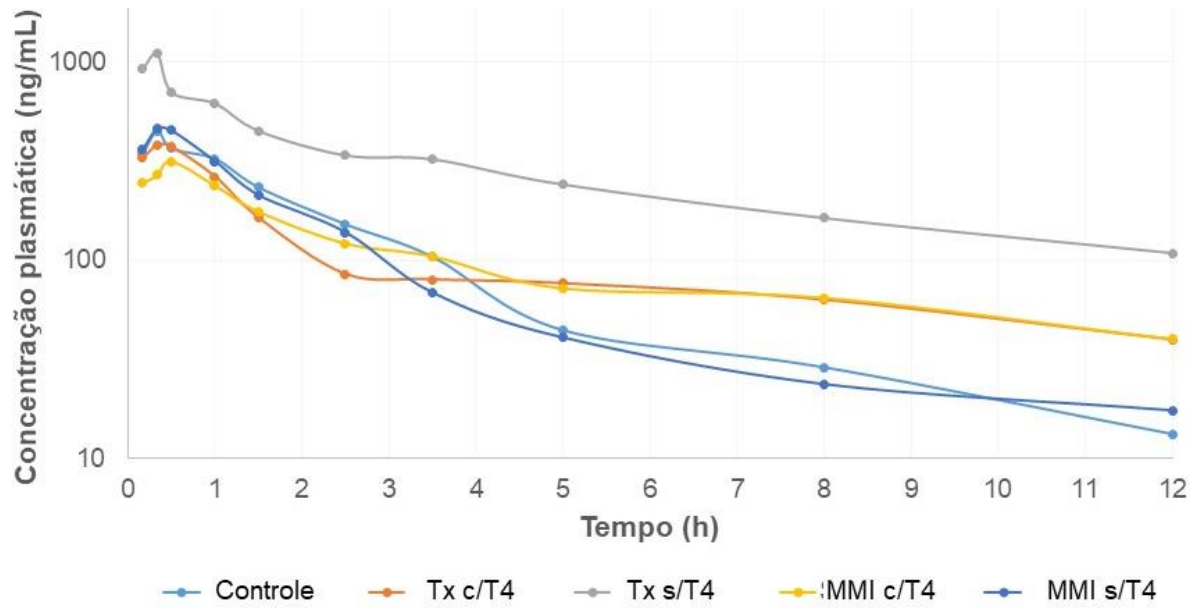
<sup>a</sup> p<0,05 em comparação ao MMI c/T4

<sup>aaa</sup> p<0,001 em comparação ao MMI c/T4

<sup>†</sup> p<0,05 em comparação ao MMI s/T4

<sup>††</sup> p<0,01 em comparação ao MMI s/T

Figura 20 - Curvas de concentração plasmática de venlafaxina em função do tempo.



Fonte: Do autor

Legenda: SHAM: animais controle; Tx c/T4: tireoidectomizados com reposição hormonal de tiroxina (20µg/kg/dia V.O); Tx s/T4: tireoidectomizados sem reposição hormonal de tiroxina; MMI c/T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) e reposição hormonal de tiroxina (20µg/kg/dia V.O); MMI s/T4: tratamento com metimazol (0,04% p/v) sem reposição hormonal de T4.



## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Caracterização do modelo de hipotireoidismo

No presente estudo, verificou-se que ambos os modelos utilizados para indução do hipotireoidismo, seja pela tireoidectomia ou a utilização do MMI, apresentaram-se eficazes em ratos machos *Wistar*. As dosagens de T4 livre (Figura 6) e TSH (Figura 7) para os grupos sem reposição hormonal Tx e MMI, demonstraram-se semelhantes a outros estudos, onde foram obtidos valores baixos de T4 livre e elevados de TSH (KULIKOV; TORRÉSANI; JEANNINGROS, 1997; NAGAO et al., 2011, 2014; WU et al., 2013; YU et al., 2015; DA CONCEIÇÃO et al., 2016). Apesar de nossos resultados demonstrarem que, no grupo Tx com reposição hormonal os níveis de T4 não estiveram próximos aos níveis do SHAM, achados semelhante foram observados por Wu et al. (2013), que demonstram que o grupo tireoidectomizado após 4 semanas de tratamento com T4 (20 µg/kg/dia i.p.) não obteve valores semelhantes ao grupo SHAM. Além disso Bianco et al. (2014) relataram que em ratos, a monoterapia com T4 pode não normalizar simultaneamente os níveis séricos de T3, T4 e TSH. Sugerimos que essa diferença possa estar ligada ao tempo de tratamento deste grupo em questão, que foi de 21 dias. É importante ressaltar que os modelos utilizados em nosso estudo foram baseados em Da Conceição et al. (2016) para tireoidectomia, onde o quadro de hipotireoidismo em ratos *Wistar* foi induzido através da remoção da glândula e da utilização de uma solução 0,03% (p/v) de MMI durante três semanas e Wu et al. (2013) para utilização do MMI, no qual utilizou-se somente a utilização do MMI 0,04% (p/v).

Os dados sobre níveis de T4 livre e TSH corroboram com os encontrados nas massas dos tecidos extraídos, demonstrados na Figura 8. Verificou-se que nos grupos Tx e MMI sem reposição hormonal, a ausência dos HT interferiu positivamente nas massas da hipófise, adeno-hipófise e tireoide, sendo a atividade da glândula da tireoide regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano através de *feedback* negativo. A hiperplasia da hipófise se deu pelo aumento de massa da adeno-hipófise, devido ao elevado estímulo para síntese de TSH que foi provocada pela falta dos HT; efeito esse que refletiu sobre a glândula da tireoide através de estímulo para produção de T4 e T3. Porém como o MMI é um potente inibidor da síntese dos HT, a massa da

tireoide também se encontra hiperplasiada (Figura 8E). Resultado semelhante também foi relatado em um estudo com ratos machos *Wistar* (130-150g) utilizando MMI 0,02% diluído em água (CAKIC-MILOSEVIC; KORAC; DAVIDOVIC, 2004). Em relação ao grupo MMI com reposição ter apresentado valores contrários ao grupo SHAM, sugere-se que isso possa ter acontecido pelo estímulo fisiológico para produção dos HT, mesmo sendo realizada a reposição hormonal, pois o MMI inibe a síntese natural dos HT.

Sabe-se que o TAM está relacionado com o processo de termogênese, gerando calor por meio da conversão de lipídeos, atuando na regulação do balanço energético quando há um desequilíbrio. É regulado principalmente pelo sistema nervoso simpático e diversos hormônios, tais como insulina, glicocorticoides e os HT. No TAM encontram-se grande quantidade de receptores para os HT, além de uma alta expressão das enzimas D2 que realizam a conversão do T4 em T3, estando o T3 positivamente relacionado à expressão da proteína desaclopadora (UCP-1) presente na membrana das mitocôndrias, proteínas estas, responsáveis pelo aumento da termogênese (HIMMS-HAGEN, 1989; CVIJIC et al., 2004; BIANCO, 2006; LOMBARDI et al., 2015). Com base neste fato, pesquisa realizada por Lombardi et al. (2015), relacionando o hipotireoidismo com a massa do TAM, demonstrou que, em ratos, o hipotireoidismo provocou um decréscimo significativo na massa do TAM, estando este fato justificado pela redução da capacidade oxidativa máxima e da termogênese mitocondrial em relação aos animais controle, resultando assim em uma redução no número de mitocôndrias e na taxa de respiração. Além disso, foi demonstrada diminuição na imunorreação da UCP-1 (LOMBARDI et al., 2015). O mesmo foi observado em nosso estudo, onde a massa do TAM se apresenta significativamente baixa nos grupos Tx e MMI sem reposição hormonal em relação ao controle. Entretanto, foi observado que para o grupo Tx com reposição a massa do TAM não apresentou reversão no seu peso, ao se realizar a reposição hormonal com T4, em comparação ao SHAM. Uma possível causa sugerida é que os dados inferiores, obtidos na dosagem de T4 livre para o grupo Tx com reposição hormonal, possam ter interferido sobre a recuperação da massa do TAM neste grupo. Resultado contrário foi relatado por Cvijic et al. (2004), sendo que em ratos tireoidectomizados a massa do TAM aumentou, sugerindo sua maior ativação, uma vez que a termogênese obrigatória foi reduzida pela falta dos HT, porém a termogênese facultativa que ocorre sob a regulação do sistema nervoso simpático (SNS), foi aprimorada como

mecanismo compensatório no estudo de Cvijic et al. (2004), ativando a expressão das enzimas D2 que estão presentes no TAM e são responsáveis pela conversão de T4 em T3 (BIANCO; MCANINCH, 2013). Em contrapartida, esse mecanismo compensatório é reduzido em ratos com hipotireoidismo sistêmico segundo Bianco e Mcaninch, (2013), ratificando os resultados obtidos em nosso estudo, pela severa falta dos HT nos tecidos periféricos. Levando em consideração a massa do TAB perigonadal, somente o grupo Tx sem reposição demonstrou valores inferiores referente ao grupo SHAM. Comportamento semelhante foi relatado por Lombardi et al. (2015) onde foi observada pequena diferença entre os grupos com hipotireoidismo e controle, apresentando massa menor no grupo tratado com PTU. Esse resultado demonstra leve perda de gordura para o grupo Tx sem reposição, o que se encontra em concordância com o observado no delta de massa corporal em nosso estudo, visto que este grupo apresentou o menor valor frente aos demais grupos.

Pelo fato do crescimento continuado dos animais ao longo da vida, além de a secreção do hormônio de crescimento ser muito sensível aos níveis de T3, a avaliação da evolução de massa corporal é considerada um marcador adequado para definir o quadro de hipotireoidismo, sendo que para um rato de aproximadamente 100g, o ganho de massa é cessado em cerca de 3 semanas após o procedimento de tireoidectomia total, com possíveis variações decorrentes do tipo de tratamento, sendo para alguns casos necessário apenas 5 dias (BIANCO et al., 2014). Este parâmetro se mostrou condizente em relação a evolução de massa corporal observada em nosso estudo (Figura 9), onde comparando-se os grupos sem reposição hormonal Tx e MMI com o grupo SHAM, foi possível observar um decréscimo na evolução de peso por volta do 12º dia de tratamento, achados esses que estão presentes em outros estudos (CAKIC-MILOSEVIC; KORAC; DAVIDOVIC, 2004; MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006; WU et al., 2013; BIANCO et al., 2014; LOMBARDI et al., 2015; YU et al., 2015; GE et al., 2016; LÓPEZ-FONTANA et al., 2019). Apesar dos grupos TX e MMI com reposição hormonal apresentarem valores reduzidos de evolução de peso em comparação com o grupo SHAM, por volta do 18º dia para o grupo Tx e 12º dia para o MMI, esse fato foi evidenciado por Wu et al. (2013), estudo no qual se realizou a indução pela tireoidectomia e também por meio do uso MMI 0,04% p.v diluído em água. O comportamento referente à perda de massa corporal está presente em modelo animal, sendo que em humanos, o contrário é relatado, onde indivíduos com hipotireoidismo apresentam uma redução no metabolismo basal, reduzindo o gasto

de energia e conseqüentemente aumentando o peso corporal (NASCIMENTO, 2010; BIANCO et al., 2014; CHAKER et al., 2017).

Com a visualização do delta de massa corporal dos animais avaliados (Figura 10), fica nítido o declínio de peso nos grupos Tx e MMI sem reposição em relação ao início do estudo. Outros autores, Wu et al. (2013) e Lombardi et al. (2015) não obtiveram um delta negativo, porém, valores baixos ou bem próximo de um delta nulo como no estudo de Yu et al. (2015), caracterizando assim uma ausência no desenvolvimento de peso dos animais após o início do tratamento.

Quando se utiliza de substâncias para indução do hipotireoidismo, como exemplo o MMI e o PTU, é recomendável que se realize além da monitorização do ganho de peso a quantificação de ingestão de líquidos, pois estes compostos apresentam sabor amargo, podendo provocar uma desidratação nos animais (BIANCO et al., 2014). No presente estudo foi observada redução da ingestão de líquido dos grupos TX e MMI em relação ao grupo SHAM, destacando os grupos MMI com e sem reposição hormonal, cujo o consumo foi inferior durante todo o tratamento, sendo que somente por volta do 15<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia para o grupo com reposição hormonal que o consumo foi equivalente ao grupo SHAM. O mesmo comportamento foi descrito por Wu et al. (2013), onde o consumo de líquido foi reduzido para ambos os modelos, tireoidectomia e MMI, mesmo quando se realizou a reposição hormonal com T4. Uma estratégia que pode ser adotada para aumentar o consumo de líquido dos animais segundo Bianco et al. (2014), é a adição de sacarose para mascarar o sabor amargo, porém esta técnica não foi utilizada para evitar possíveis interferências nos testes comportamentais. Segundo o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (2013), o consumo de líquido diário para um rato adulto é de 10 a 20mL por dia, sendo que em nosso estudo a quantidade ingerida está nesta faixa.

## **7.2 Testes comportamentais para avaliação da depressão**

### **7.2.1 Nado forçado**

A ausência de movimentos das patas associada à posição flutuante foi considerada como imobilidade, registrando sua duração em segundos, no período do teste (5min). Foi possível observar que apenas o grupo MMI sem reposição apresentou maior tempo de imobilidade em comparação ao SHAM e aos demais grupos que realizaram a reposição hormonal. Achados similares foram relatados por Kulikov, Torr sani e Jeanningros, (1997), utilizando como agente indutor o PTU, no qual demonstraram que em ratos machos *Wistar* com hipotireoidismo o tempo de imobilidade foi maior que no grupo controle, sugerindo assim que os HT estão envolvidos em mecanismos subjacentes   vulnerabilidade ao estresse psíquico, que   um dos fatores para o desenvolvimento de comportamentos depressivos. Outros autores como Montero-Pedrazuela et al. (2006), que utilizaram-se da tireoidectomia, e Ge et al. (2014) utilizando eletrocauteriza o total da glândula, também relataram prolongamento no tempo de imobilidade dos grupos com hipotireoidismo, caracterizando assim um comportamento semelhante a depressão. Ressalta-se que os grupos com reposi o hormonal, Tx e MMI, obtiveram tempo semelhante ao SHAM, demonstrando assim a ausência de sintomas depressivos quando se realizou a reposi o com T4. Sugere-se que a diferença no tempo de tratamento entre os grupos (21 dias para Tx e 28 para MMI) possa ser um dos fatores para qual o grupo Tx sem reposi o não ter demonstrado comportamento semelhante ao grupo MMI sem reposi o no teste. Por outro lado, estudos demonstram resultados controversos aos obtidos, nos quais os animais com hipotireoidismo apresentam um menor tempo de imobilidade, e animais com hipertireoidismo um maior tempo, quando comparados com o grupo controle, fato este que designa em um comportamento antidepressivo para o hipotireoidismo e depressivo para o hipertireoidismo (YU et al., 2015; DA CONCEI O et al., 2016).

### 7.2.2 Preferência por sacarose

Por meio da avalia o de preferência   sacarose   possível se caracterizar um comportamento semelhante a depressão, pois o animal com tendências depressivas têm menor afinidade pela ingestão de sacarose. Ge et al. (2014, 2016) demonstraram em seus trabalhos a existência de rela o negativa entre o hipotireoidismo e o

hipotireoidismo subclínico em ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* com 8 semanas e o teste de preferência de sacarose, com diminuição na preferência à sacarose destes animais em relação ao grupo controle. O mesmo foi observado em nosso estudo para o grupo MMI sem reposição hormonal, determinando um comportamento depressivo neste grupo.

Os mesmos resultados controversos relatados para o nado forçado foram obtidos pelos autores Da conceição et al., (2016) e Yu et al., (2015), os quais relatam que os grupos com hipotireoidismo apresentaram maior preferência a sacarose, enquanto que para o grupo com hipertireoidismo a preferência diminuiu, atribuindo assim um comportamento antidepressivo ao hipotireoidismo.

### **7.3 Rota rod**

Sabe-se que dentre os sintomas apresentados no quadro de hipotireoidismo, a fraqueza muscular, câibras musculares e artralgia estão presentes (NASCIMENTO, 2010; CHAKER et al., 2017). Com intuito de verificar se o tempo de imobilidade apresentado no teste de nado forçado para os grupos sem reposição hormonal foram ocasionados devidos a estes sintomas, realizou-se a Rota-rod. Analisando os resultados encontrados é possível notar que não houve diferença em relação ao tempo de permanência do grupo SHAM e os demais sem reposição hormonal, validando assim o resultado encontrado no teste de nado forçado.

### **7.4 Considerações gerais sobre o método analítico desenvolvido**

O método desenvolvido se demonstrou linear na faixa de trabalho de 50 a 1000ng/mL, apresentando coeficiente de correlação de 0,9903 (Tabela 3, Figura 17). Intervalo este, que se encontra semelhante ao obtido por outros estudos, porém, por utilizarem de técnicas mais sofisticadas de extração, obtiveram LIQ de 20ng/mL, valor

menor do que encontrado em nosso método (DUBEY et al., 2013; SONG et al., 2017). Contudo, a faixa de trabalho encontrada abrange concentrações esperadas no plasma de ratos, sendo adequado para realizar as análises farmacocinéticas. Por meio dos resultados obtidos para os testes de precisão e exatidão (Tabela 4) observa-se que o método possui acurácia e repetibilidade segundo os requisitos feitos pela ANVISA.

A venlafaxina se demonstrou estável frente às condições testadas de curta duração e pós processamento, obtendo desvios inferiores a 15%, resultado que comprova a estabilidade do analito em relação às condições utilizadas em nosso estudo.

Pelo teste de efeito matriz foi possível caracterizar a ausência de interferências da matriz (plasma) na quantificação do analito e do PI. Outro resultado importante foi inexistência de efeito residual significativo no método.

O tempo total de análise cromatográfica foi de 12 min, o mesmo relatado por Song et al. (2017), no qual nossa metodologia foi baseada. Os picos de venlafaxina e diazepam (Figura 16) obtiveram tempo de retenção distintos (7,01 e 9,88min respectivamente) e com boa resolução. A extração líquido-líquido utilizando hexano e acetato de etila na proporção 70:30, seguida de agitação e centrifugação, foi eficaz na remoção das impurezas que podem danificar o sistema cromatográfico e a coluna. O modelo se difere da metodologia base de Song et al. (2017), na qual se utilizam de extração em fase sólida (SPE), contudo, a extração foi escolhida com base nas condições do Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos da Universidade Federal de Alfenas.

## 7.5 Análise farmacocinética

Os resultados encontrados no grupo SHAM encontram-se divergentes dos presentes na literatura, onde por meio da administração oral de venlafaxina na mesma dose de 20mg/kg de venlafaxina, Song et al. (2017) obtiveram AUC de 161 ng.h/mL,  $t_{1/2}$  de 2,4h,  $C_{máx}$  de 46ng/mL e *clearance* de 111,02 L/h/kg; cerca de 10 vezes maior que os valores obtidos para nosso grupo controle no  $Cl_{T/f}$ , refletindo nos outros parâmetros. Sugerimos que essa diferença se deva ao fato que Song e colaboradores utilizaram ratos da raça *Sprague-Dawley*, metade macho e metade fêmea, pesando

entre 260 a 280g. Já em nosso estudo utilizamos ratos machos *Wistar* que ao final do tratamento os animais controles possuíam em média 335g.

Relatos de estudos realizados com outras doses para venlafaxina também apresentaram parâmetros farmacocinéticos diferentes dos nossos achados (DUBEY et al., 2013; XIAO et al., 2018). Utilizando-se de ratos machos *Wistar* pesando de 180 a 220g, administrando 30mg/kg de venlafaxina por via oral, Dubey et al. (2013) obtiveram AUC de 2920ng.h/mL,  $t_{1/2}$  de 3,13h,  $C_{m\acute{a}x}$  de 1480ng/mL e clearance de 41,03L/h/kg, já Xiao et al. (2018), trabalhando com fêmeas de 200 a 300g, administrando dose de 200mg/kg, observou AUC de 49164 ng.h/mL,  $t_{1/2}$  de 2,03h e  $C_{m\acute{a}x}$  de 11095ng/mL.

Comparando os valores encontrados para o grupo SHAM (Tabela 8) entre os grupos Tx e MMI com reposição hormonal, fica evidente que a reposição diária de T4 via oral foi capaz normalizar todos os parâmetros farmacocinéticos, visto que, nenhuma diferença foi observada entre estes grupos. Entretanto o grupo Tx sem reposição hormonal demonstrou diferença relevante frente todos os grupos em estudo, destacando-se a comparação ao grupo SHAM, apresentando AUC maior (4403,7ng.h/mL vs. 1037,5 ng.h/mL;  $p < 0,01$ ), conseqüentemente um  $t_{1/2}$  superior (2,95h vs. 1,29h;  $p < 0,05$ ), um *clearance* reduzido (4,237L/h/kg vs. 19,765 L/h/kg;  $p < 0,01$ ) e a  $C_{m\acute{a}x}$  elevada (880,35ng/mL vs. 432,23ng/mL;  $p < 0,05$ ).

Como os HT estão ligados ao metabolismo de proteínas (NASCIMENTO, 2010; CHI et al., 2013; CHAKER et al., 2017), realizou-se a quantificação de proteínas plasmáticas pelo método de Bradford com intuito de verificar se as alterações farmacocinéticas observados no grupo Tx sem reposição hormonal poderiam ser provenientes de modificações na quantidade de proteínas plasmática, visto que a venlafaxina se liga em torno de 27% à essas proteínas (DRUGBANK, 2019). Contudo os valores demonstraram-se homogêneos (Figura 15) entre os grupos, descartando a hipótese de relação entre as proteínas plasmáticas e as alterações farmacocinéticas observadas (Tabela 8).

Chung e colaboradores, (2012) em seus estudos observaram correlação entre a falta dos HT presentes no hipotireoidismo e a incidência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGA), comorbidade esta, que pode estar associada à esteatose simples, cirrose e até mesmo ao carcinoma hepático (MARCHESINI et al., 2001; ADAMS et al., 2017). O mecanismo entre essa correlação permanece desconhecido (CHI et al., 2013), entretanto, uma vez que no hipotireoidismo a falta



dos HT está relacionada ao aumento do colesterol, a dislipidemia é fator relevante para o desenvolvimento de DHGA nestes indivíduos (CHUNG et al., 2012). Visto que a venlafaxina sofre intenso metabolismo de primeira passagem no fígado pela enzima CYP2D6 (DRUGBANK, 2019), sugerimos que as alterações farmacocinéticas encontradas no grupo Tx sem reposição hormonal de T4 possam estar relacionadas à queda no metabolismo da venlafaxina, devido a diminuição da função hepática pela ausência dos HT, reduzindo assim o clearance, provocando como consequência, o aumento da biodisponibilidade, concentração máxima e  $t_{1/2}$ . Relacionado ao dano hepático Chi et al. (2013) relataram que os HT possuem efeito hepatoprotetor, estimulando o crescimento e proliferação de células hepáticas, demonstrando potencial terapêutico associado aos análogos do T3 frente às doenças hepáticas, o que pode ajudar a compreender a equivalência dos resultados obtidos para os grupos Tx e MMI com reposição hormonal em comparação ao grupo SHAM. Por outro lado, o grupo MMI sem reposição hormonal apresentou comportamento divergente em relação ao Tx sem reposição, demonstrando valores similares aos encontrados no grupo SHAM. Por se tratar apenas de um modelo de indução química, partindo da utilização de MMI diluído em água potável, e que por meio da conversão do hormônio T4 em T3 realizada pelas enzimas desiodases nos órgãos alvos dos HT, leva-se tempo para desenvolver um hipotireoidismo sistêmico (BIANCO et al., 2014). Acreditamos que a expressão da enzima D1 possa ter exercido mecanismo compensatório a inibição da síntese dos HT, sendo a D1 altamente presente no fígado, suprindo assim as necessidades dos HT locais e sistêmicas, não interferindo na farmacocinética da venlafaxina no grupo MMI sem reposição hormonal (BIANCO et al., 2014; BERNE; LEVY, 2010; MEYER; WAGNER; MAIA, 2007; NUNES, 2003). Entretanto para que se possa comprovar esta teoria, a quantificação das desiodases nos tecidos alvos dos HT deveria ser realizada.

. Para a venlafaxina, em ratos Wistar, não foram observadas alterações que possam comprovar a hipótese de que o hipotireoidismo pode alterar a farmacocinética do antidepressivo, administrado em dose única, levando à falha terapêutica, pois os grupos sem reposição hormonal não apresentaram menores valores de AUC.

## 8 CONCLUSÕES

São as conclusões de nosso estudo:

- a) O quadro de hipotireoidismo clínico foi estabelecido com sucesso para ambos os modelos experimentais (tireoidectomia e MMI), sendo que a reposição hormonal de T4 na dose de 20 µg/kg/dia foi eficaz para grupos Tx e MMI, uma vez que os mesmos atingiram níveis fisiológicos;
- b) apenas o grupo MMI sem reposição hormonal apresentou indícios de comportamento depressivo avaliado pelos testes de nado forçado e preferência à sacarose;
- c) o método analítico desenvolvido e validado para análise de venlafaxina em plasma de ratos apresentou limites de confiança adequados à aplicação em estudo farmacocinético;
- d) a reposição hormonal realizada nos grupos Tx e MMI foi adequada para normalização dos parâmetros farmacocinéticos em comparação com o grupo SHAM;
- e) o hipotireoidismo apresentado no grupo Tx sem reposição hormonal interferiu nos parâmetros farmacocinéticos da venlafaxina com a redução do *clearance*, provocando como consequência, aumento do AUC,  $t_{1/2}$  e  $C_{máx}$ ;
- f) a falta de reposição hormonal não provocou redução da biodisponibilidade nos grupos MMI ou Tx tratados com venlafaxina via oral em dose única.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, L. A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. **Gut**, v. 66, n. 6, p. 1138–1153, June. 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília-DF, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Brasília-DF, 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027\\_17\\_05\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html)>. Acesso em: 06 jul. 2019.

ARAUJO, A. S. D. R. **Influência do hipotireoidismo no dano oxidativo e nas defesas antioxidantes**. 2002. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2002.

BADESCH, D. B. et al. Hypothyroidism and primary pulmonary hypertension: An autoimmune pathogenetic link? **Annals of Internal Medicine**, v. 119, n. 1, p. 44–46, July, 1993.

BAUER, M.; HEINZ, A.; WHYBROW, P. C. Thyroid hormones , serotonin and mood : of synergy and significance in the adult brain. **Molecular Psychiatry**, v. 7, n. June 2001, p. 140–156, 2002.

BERENT, D. et al. Thyroid hormones association with depression severity and clinical outcome in patients with major depressive disorder. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2419–2425, Apr, 2014.

BERNE, Robert M.; LEVY, Matthew N. (ed.). **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

BIANCO, A. C. et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. **Thyroid**, v. 24, n. 1, p. 88–168, 2014.

BIANCO, A. C. Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 281–289, 2006.

BIANCO, A. C.; MCANINCH, E. A. The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 1, n. 3, p. 250–258, Nov. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, May 1976.

CAKIC-MILOSEVIC, M.; KORAC, A.; DAVIDOVIC, V. Methimazole-induced hypothyroidism in rats: Effects on body weight and histological characteristics of thyroid gland. **Jugoslavenska Medicinska Biohemija**, v. 23, n. 2, p. 143–147, 2004.

CALLOU, M. R. DE A.; RAMOS, P. R. M. Hipertensão arterial pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 110–178, 2009.

CHAKER, L. et al. Hypothyroidism. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1550–1562, Sept. 2017.

CHEN, S. et al. The effect of thyroid function on clinical outcome in patients with heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 16, n. 2, p. 217–226, 2014.

CHI, H. C. et al. Molecular functions of thyroid hormones and their clinical significance in liver-related diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

CHUNG, G. E. et al. Non-alcoholic fatty liver disease across the spectrum of hypothyroidism. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 1, p. 150–156, July. 2012.

COOKE, J. D.; GROVER, L. M.; SPANGLER, P. R. Venlafaxine treatment stimulates expression of brain-derived neurotrophic factor protein in frontal cortex and inhibits long-term potentiation in hippocampus. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 1411–1419, 2009.

CORTÉS, C. et al. Hypothyroidism in the adult rat causes incremental changes in brain-derived neurotrophic factor, neuronal and astrocyte apoptosis, gliosis, and deterioration of postsynaptic density. **Thyroid**, v. 22, n. 9, p. 951–963, 2012.

CVIJIĆ, G. et al. Effect of cold exposure on serum dbh and interscapular brown adipose tissue mao activity in hypothyroid t 3 - and t 4 -treated rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, n. 1, p. 214–218, June, 2004.

DA CONCEIÇÃO, R. R. et al. Antidepressant behavior in thyroidectomized Wistar rats is induced by hippocampal hypothyroidism. **Physiology and Behavior**, v. 157, p. 158–164, 2016.

DrugBank database. **Venlafaxine**. [20--?] Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00285>>. Acesso em: 06 July 2019.

DUBEY, S. K. et al. Rapid sensitive validated UPLC-MS method for determination of venlafaxine and its metabolite in rat plasma: Application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 6, p. 466–471, 2013.

DUNTAS, L. H. Thyroid disease and lipids. **Thyroid**, v. 12, n. 4, p. 287–293, 2002.

- GE, J. F. et al. Depression-like behavior in subclinical hypothyroidism rat induced by hemi-thyroid electrocauterization. **Endocrine**, v. 45, n. 3, p. 430–438, 2014.
- GE, J.-F. et al. Resveratrol ameliorates the anxiety- and depression-like behavior of subclinical hypothyroidism rat: possible involvement of the HPT axis, HPA axis, and Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. 4, p. 417–425. May, 2016.
- GILBERT, J. Hypothyroidism. **Medicine**, v. 45, n. 8, p. 506–509, 2017.
- HARMS, P. G; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**. v. 36(3):391-2, Mar.1974.
- HASEGAWA, M.; WADA, H. Developmental hypothyroidism disrupts visual signal detection performance in rats. **Physiology & Behavior**, v. 112–113, p. 90–95, Mar. 2013.
- HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. **Progress in Lipid Research**, v. 28, n. 2, p. 67–115, Jan. 1989.
- ITO, M. et al. Effect of levo-thyroxine replacement on non-high-density lipoprotein cholesterol in hypothyroid patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 608–611, 2007.
- JABBAR, A. et al. Thyroxine in acute myocardial infarction (ThyrAMI) - levothyroxine in subclinical hypothyroidism post-acute myocardial infarction: study protocol for a randomised controlled trial. **Trials**, v. 115, n. 16, p. 1–13, 2015.
- JANKOVIĆ, D. et al. Prevalence of endocrine disorders in morbidly obese patients and the effects of bariatric surgery on endocrine and metabolic parameters. **Obesity surgery**, v. 22, n. 1, p. 62–9, 2012.
- JANSSEN, I. M. C. et al. Subclinical hypothyroidism and its relation to obesity in patients before and after Roux-en-Y gastric bypass. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1257–1263, 2015.
- JIANG, F. et al. The influences of CYP2D6 genotypes and drug interactions on the pharmacokinetics of venlafaxine: Exploring predictive biomarkers for treatment outcomes. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 11, p. 1899–1909, 2015.
- KULIKOV, A.; TORRÉSANI, J.; JEANNINGROS, R. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. **Neuroscience Letters**, v. 234, n. 2–3, p. 111–114, 1997.
- KUMAR, N. et al. Fatigue, weight gain, lethargy and amenorrhea in breast cancer patients on chemotherapy: is subclinical hypothyroidism the culprit? **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 2, p. 149–159, Jan. 2004.

- LAPMANEE, S. et al. Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 20–28, 2012.
- LAPMANEE, S.; CHAROENPHANDHU, J.; CHAROENPHANDHU, N. Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety- and depression-like behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 316–325, Aug. 2013.
- LOMBARDI, A. et al. 3,5-diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–22, 2015.
- LÓPEZ-FONTANA, C. M. et al. Effects of hypothyroidism on the mesenteric and omental adipose tissue in rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 490, p. 88–99, Apr. 2019.
- MADARIAGA, A. G. et al. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in europe: a meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 3, p. 923–931, 1 Mar. 2014.
- MARCHESINI, G. et al. Non-alcoholic fatty liver disease. **Current Science**, v. 50, p. 1–5, Aug. 2001.
- MARTINO, D. J.; STREJILEVICH, S. A. Subclinical hypothyroidism and neurocognitive functioning in bipolar disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 61, p. 166–167, Feb. 2015.
- MEYER, E. L. S.; WAGNER, M. S.; MAIA, A. L. Expressão das iodotironinas desidases nas neoplasias tireoidianas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 5, p. 690–700, jul. 2007.
- MIURA, Y. et al. Identification of new prognostic factors of pulmonary hypertension. **Circulation Journal**, v. 74, n. 9, p. 1965–1971, 2010.
- MONTERO-PEDRAZUELA, A. et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 361–371, 2006.
- MORENO, R. A.; MORENO, D. H.; SOARES, M. B. DE M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, n. suppl 1, p. 24–40, maio 1999.
- NAGAO, H. et al. Effects of triiodothyronine on turnover rate and metabolizing enzymes for thyroxine in thyroidectomized rats. **Life Sciences**, v. 116, n. 2, p. 74–82, 2014.
- NAGAO, H. et al. Influence of thyroidectomy on thyroxine metabolism and turnover rate in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 210, n. 1, p. 117–123, 2011.

NASCIMENTO, M. P. **Efeitos do hipertireoidismo em modelos experimentais de ansiedade, pânico e depressão em ratos**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2010.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Manual-Cuidados-com-Animais.pdf>>. Acesso em: 03 jul. 2019.

NUNES, M. T. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, p. 639–643, 2003.

O'BRIEN, T. et al. Hyperlipidemia in Patients With Primary and Secondary Hypothyroidism. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 68, n. 9, p. 860–866, Sept. 1993.

OZGUR, Z. et al. Anatomical and surgical aspects of the lobes of the thyroid glands. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 268, n. 9, p. 1357–1363, 2011.

PEETERS, R. P. Subclinical Hypothyroidism. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 26, p. 2556–2565, 2017.

PERITO, M. E. S.; FORTUNATO, J. J. Marcadores biológicos da depressão: Uma revisão sobre a expressão de fatores neurotróficos. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 4, p. 597–603, 2012.

PESTANA, F. M. **Avaliação comportamental e dos níveis séricos e metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos em ratos submetidos ao estresse social seriado**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Patologia e Ciências Clínicas) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 2010.

PIETRACCI, E. et al. Simultaneous determination of new-generation antidepressants in plasma by gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, p. 124–132, 2012.

RASHID, S. Q. Thyroid gland standard for bangladeshi population and prevalence of unknown pathologies in the normal population. **Journal of Medical Ultrasound**, v. 24, n. 3, p. 101–106, 2016.

RIZVI, I. et al. Widespread intracranial calcification, seizures and extrapyramidal manifestations in a case of hypoparathyroidism. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 8, p. 369–372, 2012.

ROBINSON, K. A.; MIDDLETON, W. D. Ultrasonographic evaluation of the thyroid. **Ultrasound Clinics**, v. 9, n. 3, p. 325–337, 2014.

RODRIGUES, R. F. **Influência da duloxetina e amitriptilina na farmacocinética e efeito biológico da pregabalina para tratamento da dor crônica em animais**. 2016. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, 2016.

SÁNCHEZ ROMÁN, J. et al. Disfunción tiroidea en pacientes con hipertensión arterial pulmonar. Estudio de una cohorte de 58 pacientes. **Medicina Clínica**, v. 132, n. 18, p. 695–700, 2009.

SONG, L. et al. Rapid solid-phase extraction coupled with GC-MS method for the determination of venlafaxine in rat plasma: Application to the drug-drug pharmacokinetic interaction study of venlafaxine combined with fluoxetine. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 17, p. 3462–3468, 2017.

STABOULI, S.; PAPA KATSIKA, S.; KOTSIS, V. Hypothyroidism and hypertension. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 8, n. 11, p. 1559–1565, 10 nov. 2010.

TEKSOZ, S. et al. The effect of thyroid gland weight on early complications in total thyroidectomy : cerrahpasa experience. **Hellenic Journal of Surgery**, p. 28–31, 2017.

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). **Doses de agentes para ratos**. Alfenas-MG, [2016?] Disponível em: < <https://www.unifal-mg.edu.br/ceua/system/files/anexos/Conte%C3%BAdo%20da%20pasta%20para%20laborat%C3%B3rios%20de%20pesquisa.pdf> >. Acesso em: 01 out. 2018.

WEBER, J. et al. Interdependence of thyroglobulin processing and thyroid hormone export in the mouse thyroid gland. **European Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 5, p. 440–456, 2016.

World Health Organization (WHO). **Depression**. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em: 02 june 2019.

WU, S. et al. Metabolic profiling provides a system understanding of hypothyroidism in rats and its application. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

XIAO, Y. et al. Validation of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of icotinib and its four major circulating metabolites in human plasma and its application in a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 11, p. e4327, Nov. 2018.

YU, D. et al. The bidirectional effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on anxiety- and depression-like behaviors in rats. **Hormones and Behavior**, v. 69, p. 106–115, Mar. 2015.



## ANEXOS

### Anexo A – Parecer do comitê de ética e pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do hipotireoidismo induzido experimentalmente na farmacocinética da venlafaxina", registrada com o nº 67/2017, sob a responsabilidade de Vanessa Bergamin Boralli Marques, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino ( X ) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 08/11/2017 a 31/07/2019           |
| Espécie/linhagem/raça   | Rato Wistar / heterogênico           |
| Nº de animais           | 111                                  |
| Sexo                    | Machos                               |
| Origem                  | Biotério Central da UNIFAL           |

Alfenas, 08 de Novembro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador CEUA-UNIFAL