

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS**

VICTOR AUGUSTO ALVES COSTA

**HIPOTIREOIDISMO MATERNO E OS EFEITOS RENAIIS PARA A PROLE JOVEM E ADULTA DE
RATAS WISTAR**

UBERLÂNDIA

2020

VICTOR AUGUSTO ALVES COSTA

HIPOTIREOIDISMO MATERNO E OS EFEITOS RENAIIS PARA A PROLE JOVEM E ADULTA DE RATAS WISTAR

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título em Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

UBERLÂNDIA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-
 902 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico número 005/2020, do PPGBC				
Data:	13/03/2020	Hora de início:	[14h00]	Hora de encerramento:	[16h30]
Matrícula do Discente:	1812BCE003				
Nome do Discente:	Victor Augusto Alves da Costa				
Título do Trabalho:	Hipotireoidismo materno e os efeitos renais para a prole jovem e adulta de ratas Wistar				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia dos Sistemas Cardiovascular e Renal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se no Laboratório de Práticas Virtuais, no Bloco 2A, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Simone Ramos Deconte – IFASC; Luiz Borges Bispo da Silva – UFU; e Ana Paula Coelho Balbi**, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). **Ana Paula Coelho Balbi**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Coelho Balbi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/03/2020, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Borges Bispo da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/03/2020, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos Deconte, Usuário Externo**, em 16/03/2020, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1919992** e o código CRC **BE92B034**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

C837	Costa, Victor Augusto Alves, 1996-2020 Hipotireoidismo materno e os efeitos renais para prole jovem e adulta de ratas Wistar [recurso eletrônico] / Victor Augusto Alves Costa. - 2020. Orientadora: Ana Paula Coelho Balbi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.574 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Citologia. I. Balbi, Ana Paula Coelho ,1976-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título. CDU: 576.3
------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo
com o AACR2: Gizele Cristine Nunes do Couto -
CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

VICTOR AUGUSTO ALVES COSTA

**HIPOTIREOIDISMO MATERNO E OS EFEITOS RENAIIS PARA A PROLE JOVEM
E ADULTA DE RATAS WISTAR**

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para obtenção do título em Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi

Banca examinadora:

Presidente (Orientador): Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi - UFU

Titular Interno: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo da Silva - UFU

Titular Externo: Profa. Dra. Simone Ramos Deconte - FADISC

Suplente Externo: Profa. Dra. Samara Urban de Oliva - UNIFESP

Suplente Interno: Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel – UFU

UBERLÂNDIA

2020

AGRADECIMENTOS

A Deus porque pra mim fé e ciência andam juntas, lado a lado e devemos considerar a existência de ambas.

A minha mãe Nádia, pai Leonizio, avós maternos Cloves e Marly, por tudo que eles fizeram e ainda fazem por mim, para que possa realizar meus sonhos, concluindo desta forma, mais uma etapa importante desse ciclo acadêmico, que escolhi.

As minhas amigas de laboratório Jéssica, Lívia, Rafaella que contribuíram muito, para as realizações feitas neste trabalho, seja pela doação de material didático para estudo ou obra prima mais mão de obra especializada, para realização dos experimentos.

A minha turma da 121 Maria Vitória, Amanda, Fer Bus, Léia, Bruno e em especial ao Mateus, que me aguentaram ao longos desses anos e compartilhando momentos ímpares , tornando a rotina, mais leve e divertida. E a todas as amigades que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para minha história.

A equipe técnica do 2A, Cris, Simone, Tais, Dani, Isa, Dona Jô e Fatinha por sempre estarem lá, facilitando o acesso aos laboratórios, ajudando a processar material, ensinando, fazendo um café ou apenas fazendo companhia nas horas de intervalo entre um experimento e outro, ou entre as refeições.

A minha orientadora sem defeitos, Ana Paula, que além de me ensinar todo dia como ser um profissional exemplar e dedicado, a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, e principalmente por ter acreditado e ter tido paciência para acompanhar minha evolução ao longo desses 5 anos caminhada.

Ao professor Luiz Bispo por ser o Luiz Bispo e por todos os ensinamentos que vão muito além de sala de aula ou laboratório.

A banca examinadora por ter aceitado o convite de avaliar e contribuir para a melhoria deste trabalho.

*“Shine bright like a diamond
We're beautiful, like diamonds in the sky”*

Rihanna

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(hCG): Gonadotrofina Coriônica
 α -SMA: α -actina do músculo liso
CT: Colesterol
DIT: Diiidotirosina
DIT: Diiidotirosinas
DPN: Dia pós-natal
DE: Dia embrionário
EUP: Excreção Urinária de Proteína
CONTROLE: Grupo controle
EXPERIMENTAL 1: Grupo gestação
EXPERIMENTAL 2: Grupo gestação e lactação
HT: Hormônios Tireoidianos
ICBIM: Instituto de Ciências Biomédica
kDa: Quilodalton
MIT: Monoiodotirosina
NHE: Contratransportador sódio-hidrogênio
NIS: Proteína Cotransportadora de sódio-cloreto
PAS: Pressão Arterial Sistólica
PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular
PTU: Propiltiuracil
SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
T3: Triiodotironina
T3r: Triiodotironina reverso
T4: Tiroxina ou tetraiodotironina
TBG: Tireoglobulina
TBI: Tubulointersticial
TFG: Taxa de Filtração Glomerular
TG: Tufo glomerular
TGL: Triglicerídeos
TPO: Tireoperoxidase
TRH: Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH: Hormônio Estimulante da Tireoide

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL.....	13
1.2 TIREOIDE.....	14
1.3 HIPOTIREOIDISMO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS	17
1.4 SISTEMA RENAL.....	17
1.5 TIREOIDE E OS RINS	19
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Delineamento Experimental	22
4.3 Coleta de rins, determinação da relação peso renal/peso corporal	23
4.4 Determinação do Perfil Lipídico	23
4.5 Determinação da PAS.....	24
4.6 Estudos de função renal.....	24
4.7 Dosagem de HT	25
4.8 Estudos de Morfometria	25
4.9 Estudos Imunohistoquímicos.....	25
4.10 Avaliação dos estudos imunohistoquímicos.....	25
4.11 Análise estatística	26
5. RESULTADOS	26
5.1 DADOS MATERNOS	26
5.2 DADOS DA PROLE	28
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS	43

Resumo

Quando o ambiente intrauterino é perturbado por fatores como tabagismo, estresse, distúrbios neurológicos, infecções, doenças endócrinas, entre outros, a prole pode ter seu desenvolvimento comprometido e apresentar doenças na vida adulta. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações renais na prole jovem e adulta de ratas *Wistar* expostas ao hipotireoidismo somente na gestação ou durante a gestação e lactação. Para isso, os filhotes fêmeas de 30 e 90 dias (D) foram divididos em 3 grupos: Controle (CONTROLE - C) – filhotes de mães expostas ao eutireoidismo na gestação e lactação, Grupo Gestação (EXPERIMENTAL 1 – E1) – filhotes de mães expostas ao hipotireoidismo gestacional e Grupo Gestação/Lactação (EXPERIMENTAL 2 – E2) - filhotes de mães expostas ao hipotireoidismo gestacional e lactacional. Foram avaliados parâmetros maternos como consumo de ração e de líquidos, variação de peso corporal e dosagens de T3 e T4, e parâmetros na prole como dosagens de T3 e T4, provas de função e lesão renal e coleta de rins para estudos morfométricos e imunohistoquímicos. Não houve diferenças entre os grupos para parâmetros maternos como consumos hídrico e alimentar e ganho de peso na gestação, mas as mães de E2 apresentaram níveis menores de T3 e T4, em relação aos grupos C e E1. Os filhotes de 30D dos grupos E1 e E2 apresentaram menor peso corporal, mas somente os do grupo E2 tiveram menor peso renal relativo comparados ao grupo C. Dados como colesterol total, triglicérides, pressão arterial sistólica e frequência cardíaca não foram diferentes entre os grupos, mas a função renal e perda de proteínas urinárias foram menores em E2, em relação aos controles. Os animais experimentais de 30D tiveram menores áreas de corpúsculo renal e tufo glomerular, mas esta última só permaneceu reduzida nos animais de 90D de E2, enquanto houve aumento do espaço capsular nesses animais. O número de células em proliferação foi maior no compartimento tubulointersticial (TBI) dos animais experimentais de 30D, assim como houve aumento da expressão de alfa actina TBI, mas somente em E2. Os níveis de T3 só estavam reduzidos nos animais de 90D de E2, enquanto os de T4 não foram diferentes. O hipotireoidismo materno é capaz de programar alterações estruturais renais importantes na prole jovem de ratas *Wistar*, que podem resultar em perda de função renal na vida adulta. Essas alterações são mais evidentes quando o hipotireoidismo materno é mantido até o período da amamentação.

Palavras chave: hipotireoidismo materno, função renal, prole, ratas *Wistar*.

Abstract

When the intrauterine environment is disturbed by factors such as smoking, stress, neurological disorders, infections, endocrine diseases, among others, the offspring may have its development compromised and present diseases in adulthood. Thus, the objective of this study was to evaluate renal changes in young and adult offspring from Wistar rats exposed to hypothyroidism only during pregnancy or during pregnancy and lactation. For this, the 30 and 90 days-old (D) female pups were divided into 3 groups: Controls (CONTROL - C) - pups from mothers exposed to euthyroidism during pregnancy and lactation, Gestation Group (EXPERIMENTAL 1 – E1) – pups from mothers exposed to gestational hypothyroidism and Pregnancy/Lactation Group (EXPERIMENTAL 2 – E2) – pups from mothers exposed to gestational and lactational hypothyroidism. Maternal parameters such as food and water intake, body weight variation and T3 and T4 measurements and parameters in the offspring such as T3 and T4 plasmatic levels, tests of renal function and injury and kidney removal for morphometric and immunohistochemical studies were evaluated. There were no differences between groups for maternal parameters such as water and food consumption and weight gain during pregnancy, but mothers from E2 had lower T3 and T4 levels, compared to C and E1 groups. The 30D pups from the experimental groups had lower body weight, while only the E2 pups had lower relative renal weight. Data such as total cholesterol, triglycerides, systolic blood pressure and heart rate were not different between groups, but renal function and loss of urinary proteins were lower in E2, compared to controls. The 30D experimental animals had smaller renal corpuscle and glomerular tuft areas, but the latter was only maintained in the 90D animals from E2, as well as an increase in capsular space. The number of proliferating cells was higher in the tubulointerstitial compartment (TBI) of the 30D experimental animals, as well as an increase in the expression of TBI alpha actin, but only in E2. T3 levels were only reduced in 90D animals from E2, while the T4 levels were not different. Maternal hypothyroidism is capable of programming important renal structural changes in the young offspring from Wistar rats, which can result in loss of renal function in adulthood. These changes are more evident when maternal hypothyroidism is maintained until the breastfeeding period.

Keywords: maternal hypothyroidism, renal function, offspring, *Wistar* rats.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROGRAMAÇÃO FETAL

A programação fetal ocorre quando o ambiente intrauterino é perturbado por fatores hostis, tais como, tabagismo, sedentarismo, estresse, distúrbios neurológicos, infecções, doenças endócrinas, complicações gestacionais ou qualquer situação que não é considerada adequada durante a gestação, que podem prejudicar o desenvolvimento do feto (MARCINIAK et al.; 2017).

Os primeiros estudos sobre programação fetal foram reconhecidos na década de 1970, quando dados epidemiológicos de homens e mulheres nascidos durante a segunda guerra mundial, no período de 1924 a 1945, foram avaliados e resultaram em correlações com uma maior propensão a doenças cardiovasculares na vida adulta, mas foi a partir da década de 1990 que esses trabalhos ganharam repercussão, através do pesquisador David Barker, que investigou a associação entre baixo peso ao nascimento e aumento do risco de doença coronariana na vida adulta (BERRY; BOEXPERIMENTAL 1ESS; JOHNSON, 2016; MARCINIAK et al.; 2017).

Acredita-se que algumas doenças apresentadas na vida adulta possam ter sido programadas na vida intrauterina, devido a algum distúrbio desenvolvido e mantido durante a gestação. Um exemplo disso é o diabetes durante a gestação, que influencia diretamente o padrão de crescimento do feto resultando em macrosomia, além de outras repercussões (KC; SHAKYA; ZHANG, 2015). Em modelos experimentais, o diabetes gestacional e obesidade maternas são capazes de induzir restrição de crescimento intrauterino, além de alterações metabólicas na prole, que podem resultar em Diabetes tipo 2 (ZAMBRANO; NATHANIELSZ, 2013; CAPOBIANCO et al., 2015). Estudos mostram que o ambiente intrauterino hiperglicêmico não só pode resultar em perturbações renais na prole, como a redução do número de nefros, mas também comprometer o sistema cardiovascular, levando à hipertensão (SIMEON, 2009). França-Silva, Oliveira e Balbi (2015) verificaram que o diabetes materno do tipo 1, induzido por aloxana, foi responsável por alterações estruturais renais importantes que resultaram em redução da função renal e aumentos da pressão arterial e da perda de proteínas urinárias na prole de ratas *Wistar*. Vale destacar que o *Diabetes mellitus* é um grupo heterogêneo de doenças que têm em comum a hiperglicemia, resultante de problemas na produção e secreção de insulina, quando é chamado de tipo 1, ou na ação deste hormônio na periferia do organismo, tipo 2, consequência de uma associação entre

resistência à insulina e alteração na secreção desse hormônio. Quando a doença acomete mulheres grávidas, é chamado de diabetes gestacional (AIRES, 2018).

De acordo com Garbert e colaboradores (2012), mulheres que se encontram nas fases gestacional, pós-parto ou menopausa estão mais propensas a desenvolverem outros distúrbios endócrinos como o hipotireoidismo. O hipotireoidismo durante a gestação acomete de 2 a 3% das mulheres e pode provocar complicações maternas e uma série de efeitos deletérios para a prole como: parto prematuro, aborto, retardo no crescimento fetal e no desenvolvimento neuropsicológico (BALUCAN; MORSHED; DAVIES, 2013; DOUSDAMPANIS et al., 2014; NAWROTH et al., 2004; ROVET, 2014; ZIMMERMANN, 2012; VARGAS-URICOECHEA; BONELO-PERDOMO; SIERRA-TORRES, 2014). Além disso, a criança que nasce com deficiência de hormônios tireoidianos (HT), está exposta ao atraso no seu desenvolvimento (DE ESCOBAR; OBREGON; DEL REY, 1987), além de apresentar prejuízo na coordenação motora, displegia espástica, hipotonia muscular, estrabismo e distúrbios de aprendizado (BUYUKGEBIZ, 2003).

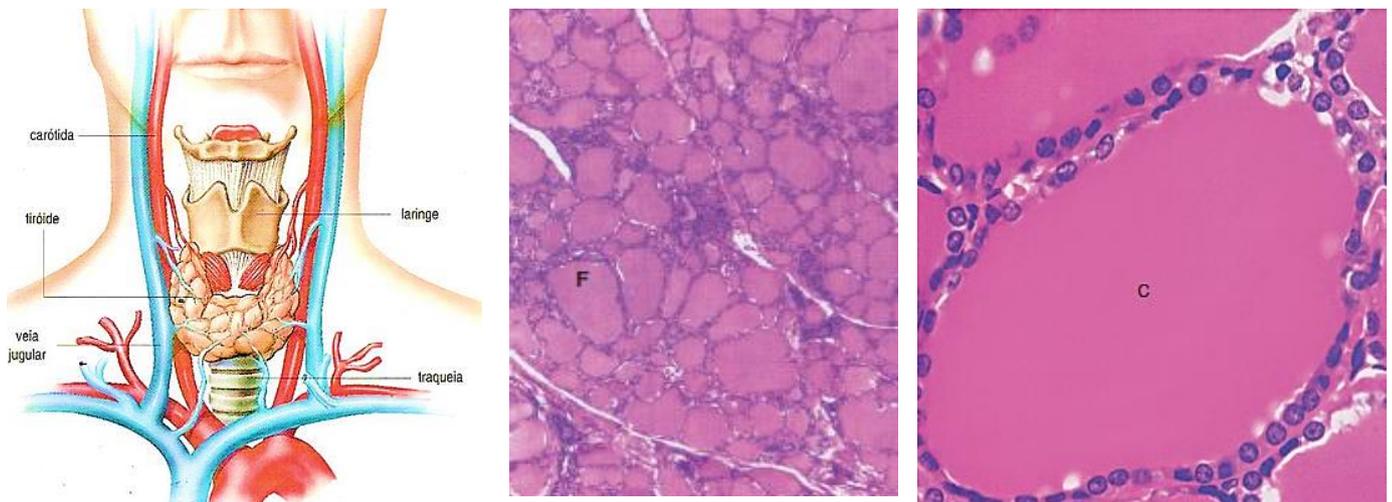
O indivíduo cuja função da tireoide está normal encontra-se no chamado estado eutireoideo. O estado clínico resultante de alteração da função tireoidiana é classificado em hipotireoidismo (baixa função) ou hipertireoidismo (função excessiva). A deficiência ou excesso na produção dos HT pode ser resultante de distúrbios em qualquer nível do eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano (MOLINA, 2014). O hipotireoidismo caracteriza-se pela diminuição ou a não produção dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina ou tetraiodotironina (T4), seja pela deficiência de iodo, causa bastante comum, ou por inflamação crônica da tireoide causada pelo sistema imune caracterizando a doença de Hashimoto (ZALETEL; GARBERSCEK, 2011). O quadro de hipotireoidismo, que tem como origem alterações na glândula tireoide, é chamado de primário, constituindo uma das causas mais comuns de doenças endócrinas, de acordo com Chakera e colaboradores (2012). Já o hipertireoidismo, que afeta estruturas centrais como hipotálamo e hipófise, é chamado de central e geralmente é causado por tumores ou irradiações, interferindo diretamente na produção de Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) ou do Hormônio Liberador de Tireotrofina (TRH) (GUPTA; LEE, 2011).

1.2 TIREOIDE

A tireoide é uma glândula alveolar, altamente vascularizada, localizada na parte anterior do pescoço, logo a frente da traqueia. Consiste em 2 lobos (direito e esquerdo)

conectados pelo istmo glandular, é formada por células foliculares (envolvidas na síntese de HT), células endoteliais, células parafoliculares ou C (secretoras de calcitonina), fibroblastos, linfócitos e adipócitos (MOLINA, 2014) (Figura 1).

Figura 1. Glândula tireoide representada macro e microscopicamente.



F: células foliculares. C: coloide.

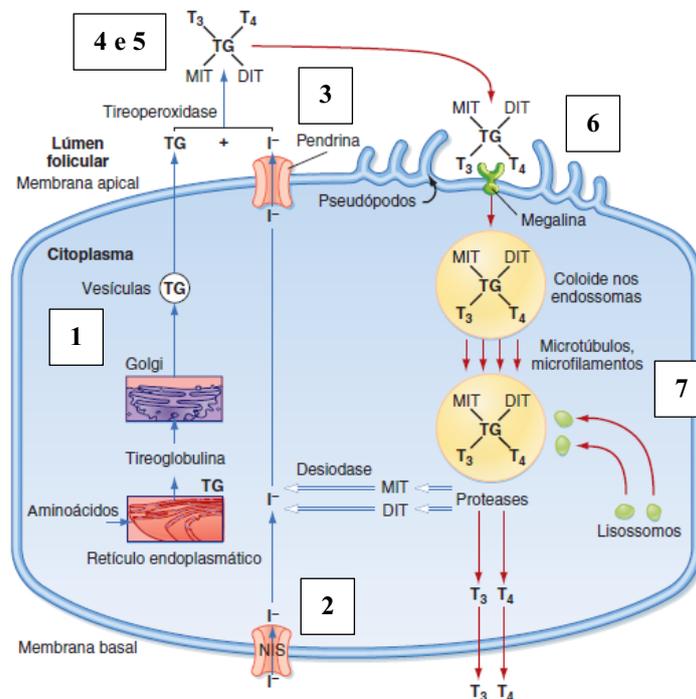
Fonte: KOEPPEN; STANTON, 2012 (modificada).

Na primeira imagem temos a representação da Tireoide, uma glândula em formato de borboleta que se localiza na região anterior a traqueia, que é dividida em dois lóbulos (direito e esquerdo) ligados pelo istmo na porção central. A segunda e a terceira imagem representam a estrutura microscópica da glândula, que consiste em folículos (F) formados por células epiteliais denominadas tireócitos que circundam um espaço chamado colóide (C).

A síntese e liberação dos HT são reguladas, por retroalimentação negativa, pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoideano. O TRH, produzido por neurônios localizados no núcleo paraventricular hipotalâmico, atua na hipófise anterior estimulando a produção de TSH, por células chamadas de tireotrofos. O TSH, por sua vez, alcança a glândula tireoide onde induz a produção e liberação de T3 e T4 para a circulação sistêmica (FEKETE; LECHAN, 2013). A liberação dos componentes centrais deste eixo (TRH e TSH) é diretamente regulada pelos periféricos (HT), de forma que a liberação de TRH e TSH é inibida principalmente por T3 (a partir da conversão de T4 em T3 no hipotálamo e hipófise,). A contribuição deste T3, de origem intracelular, na inibição de TRH e TSH, por retroalimentação, negativa é maior que a de T3 derivada da circulação (MOLINA, 2014).

A tireoide libera maiores quantidades de T4 do que de T3, de modo que as concentrações plasmáticas de T4 são 40 vezes maiores que as de T3, embora T3 seja a forma biologicamente ativa do hormônio. O T4 se liga mais efetivamente às proteínas plasmáticas de ligação e, portanto, apresenta menor taxa de depuração metabólica e meia-vida plasmática mais longa (7 dias) do que a de T3 (1 dia). Além disso, praticamente todas as células do organismo apresentam receptores para os HT e, nestas células, a maior parte de T4 será convertida em T3 pelas enzimas desiodinases. A síntese dos HT ocorre resumidamente de acordo com as seguintes etapas na Figura 2:

Figura 2. Síntese e liberação de HT pela glândula tireoide.



Fonte: KOEPPEN; STANTON 2012 (modificada).

- 1) síntese de tireoglobulina (TBG) pelos foliculos tireoidianos e seu armazenamento no lúmen folicular, onde fica o colóide;
- 2) captação de iodeto pela NIS (proteína cotransportadora de sódio-iodeto) pelos foliculos tireoidianos, a partir da corrente sanguínea, e seu transporte pelo tireócito até alcançar o colóide (pela pendrina);
- 3) oxidação do iodeto feito pelas tireoperoxidasas (TPO);
- 4) iodação da tirosinas presentes nas moléculas de TBG, dando origem às monoiodotirosinas (MIT) e às diiodotirosinas (DIT),
- 5) conjugação das iodotirosinas, de forma que a junção de MIT+DIT resulte em T3 e a de DIT+DIT, em T4;
- 6) endocitose do colóide pelo tireócito;

7) clivagem e liberação de T3 e T4 para a corrente sanguínea (KOEPPEN; STANTON, 2012).

1.3 HIPOTIREOIDISMO EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS

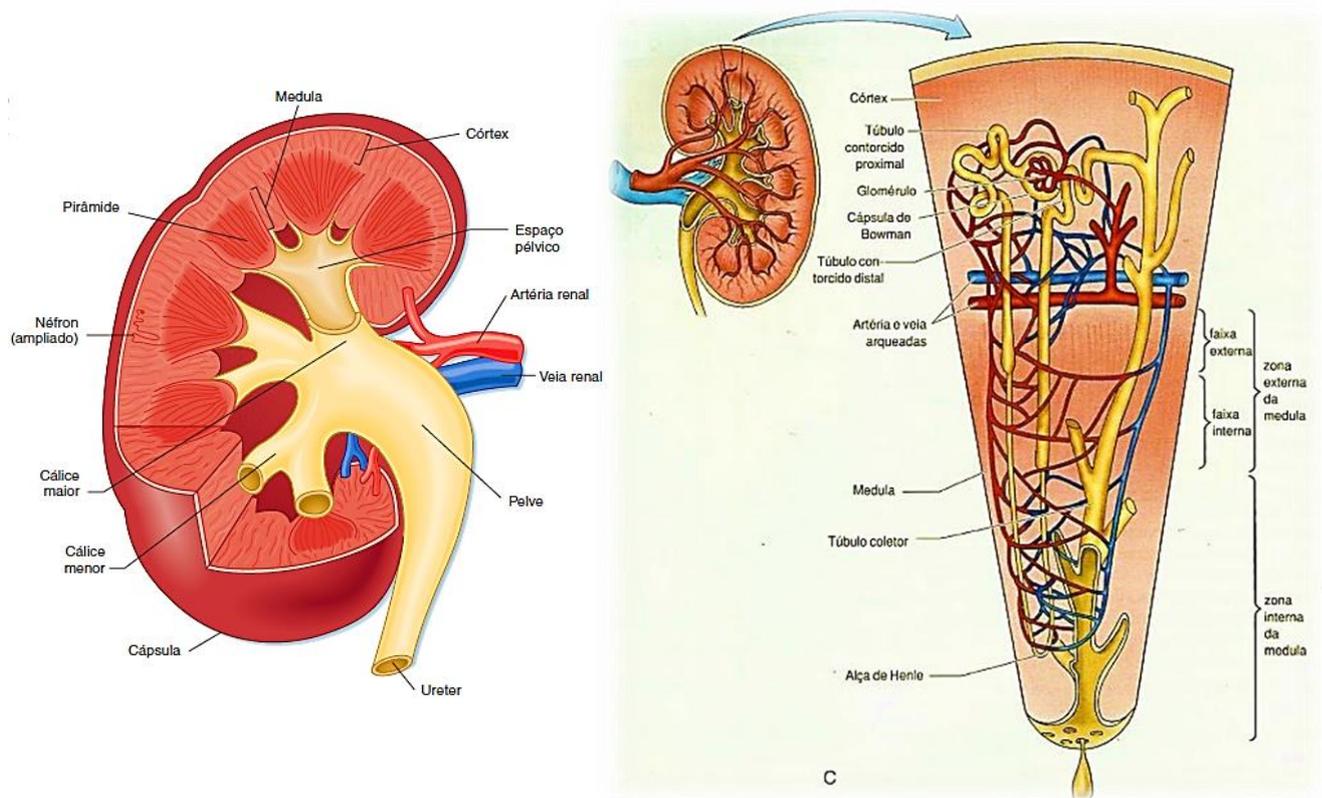
O quadro de hipotireoidismo experimental pode ser obtido pela tireoidectomia materna seguida por um tratamento com drogas antitireoideanas ou mantendo-se as ratas grávidas sob a ação de agentes antitireoideos, como 2mercapto-1-metimazol ou propiltiuracil (PTU), (ARGUMEDO; SANZ; OLGUIN, 2012; CATTANI et al., 2013; SALA-ROCA et al., 2002; ZAMONER; PESSOA-PUREUR, 2011).

Neste trabalho, optou-se pelo modelo de hipotireoidismo materno induzido pela administração de metimazol, diluído na água filtrada (0,02%) dos grupos experimentais. Esta droga bloqueia a enzima TPO, cuja função é a oxidação central do iodeto e, desta forma, a incorporação do iodo à TBG (ABUID; LARSEN, 1974). A inativação da enzima provocada pelo efeito do metimazol, tem como resultado a inibição direta da síntese de T4 e, conseqüentemente a de T3 (MOOKADAM et al., 2005).

1.4 SISTEMA RENAL

Macroscopicamente os rins são divididos em 2 regiões: uma mais clara e mais externa, chamada de córtex renal, e outra mais interna e mais escura, a medula renal, onde estão localizadas as pirâmides renais, cuja base encontra-se voltada para o córtex e o ápice termina nas papilas renais, estruturas localizadas nos cálices menores. Os cálices menores se fundem originando os cálices maiores que posteriormente se expandem, dando origem à pelve, que se alonga e passa a se chamar ureter, responsável por conduzir a urina formada pelos nefros (GANDHI; CHAVAN, 2019). Considerando a anatomia microscópica renal, destacam-se os nefros, que são uma sequência tubular composta por corpúsculo renal, o túbulo contorcido proximal, a alça de Henle, o túbulo contorcido distal e o sistema do ducto coletor, além de vários vasos sanguíneos de pequeno calibre, chamados de arteríolas e vênulas (BENTLEY; et al, 2007), como representado na figura abaixo (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura macroscópica e microscópica do rim humano.



Fonte: KOEPPEN; STANTON, 2012

Na primeira imagem temos a anatomia macroscópica do rim, que é dividido em duas regiões, córtex em tons escuros e medula em tons mais claros, está por sua vez, possui estruturas tais como pirâmides renais, cálices maiores e menores, pelve renal e ureter. Na segunda imagem observamos a anatomia microscópica, onde se destacam os nefros e suas regiões: túbulos contorcidos (proximal e distal), alça de Henle e túbulos coletores.

Os rins desempenham diversas funções no organismo, sendo sua unidade funcional denominada de nefro. Essas unidades são responsáveis pela filtração sanguínea, retenção e/ou eliminação de diversos íons, pelos processos de reabsorção e secreção tubulares, além de auxiliarem na regulação da pressão arterial, no pH dos líquidos corporais, entre outras funções, mas para que isso ocorra, o desenvolvimento deste órgão exige interações entre tecidos e eventos morfogenéticos complexos (SCHEDL, 2007).

O desenvolvimento embrionário dos rins passa por alguns estágios de formação denominados, pronefro, mesonefro e metanefro. Na maioria dos mamíferos, incluindo, portanto, humanos e roedores, os pronefros e mesonefros aparecem cedo na gestação e sofrem regressão, ao passo que os metanefros se diferenciam e dão origem ao rim adulto. Os

rins definitivos desenvolvem-se a partir do blastema metanéfrico e do broto ureteral, que é primórdio do ureter, da pelve renal, dos cálices e dos túbulos coletores (MOORE, 2008). No entanto, em humanos, todo o desenvolvimento renal ocorre durante o período de vida intrauterino, enquanto que em roedores, a conclusão deste processo só se completa após o nascimento (MICHOS, 2009). É importante destacar que a gravidez humana tem duração de mais ou menos 40 semanas, enquanto que a de ratos, de 21 dias. Por toda a complexidade inerente a esse processo, se a ela forem somadas alterações no ambiente intrauterino, algumas anomalias renais e do trato urinário podem acontecer, levando a complicações futuras (COSTANTINI; KOPAN, 2010).

1.5 TIREOIDE E OS RINS

Os efeitos dos HT consistem principalmente em estimular o metabolismo celular, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento, crescimento, metabolismo (KOEPEL, STANTON, 2012) e funcionamento adequado de todos os sistemas como: cardiovascular, renal, imunológico, reprodutor, nervoso, entre outros (VANDERPUMP, TUNBRIDGE 2005). Nos rins, os HT alteram o tamanho, peso e estrutura desses órgãos durante o desenvolvimento e em animais adultos (SLOTKIN et al, 2012), uma vez que o T3 influencia parâmetros hemodinâmicos sistêmicos e exercem importantes efeitos cardiovasculares (LOUZADA; CARVALHO, 2018). Com relação ao aspecto funcional, os HT têm efeitos pré-renais e renais diretos, os pré-renais são mediados por influência dos HT no sistema cardiovascular e fluxo sanguíneo renal; enquanto os efeitos renais diretos são mediados pelas ações dos HT na taxa de filtração glomerular (TFG), nos processos reabsortivos e secretores tubulares, bem como pela influência hormonal na fisiologia tubular renal (BASU, MOHAPATRA, 2014).

Alterações estruturais renais podem ser verificadas pela marcação para alfa actina. A actina é a principal proteína do sistema de microfilamentos de células eucarióticas. A presença da α -SMA (α -actina do músculo liso) no rim adulto em condições normais está restrita à musculatura vascular, com função de contratilidade (JOHNSON et al, 1991). Essa proteína também está expressa em maior quantidade nos glomérulos e capilares peritubulares durante o início do desenvolvimento renal e essa expressão desaparece com a maturação dos glomérulos e capilares peritubulares (TUFRO-MCREDDIE et al, 1994). Tem sido demonstrado que sob condições patológicas, as células mesangiais, tubulares e intersticiais

apresentam alterações no fenótipo, passando a expressar a alfa actina e algumas proteínas de filamentos intermediários, tornando-se potencialmente capazes de produzir mais colágeno e outros elementos da matriz extracelular (IGNOTZ, ENDO, MASSAGÉ, 1987; JOHNSON et al, 1991; EL NAHAS et al, 1996).

Durante o desenvolvimento renal, também foi observado um número elevado de células PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) positivas na zona nefrogênica nos primeiros estágios da diferenciação glomerular epitelial (MÁRQUEZ et al, 2002). O PCNA é uma proteína nuclear de 36 kDa que está associada com o ciclo celular (HALL et al, 1990) e vários estudos de imunohistoquímica realizados com anticorpos anti-PCNA mostram que eles são capazes de identificar células na fase de divisão (HALL *et al*, 1990; MARQUEZ *et al*, 2002) pois sua expressão está aumentada da fase final “G1” para as fases iniciais “S” do ciclo celular.

2. JUSTIFICATIVA

Existem dados na literatura sobre as repercussões de distúrbios tireoidianos, durante a gestação, para a própria mãe e parte dos seus efeitos ósseos e neurológicos para a prole. Jena e colaboradores (2012) até mostraram que o hipotireoidismo, induzido por PTU em neonatos, parece prejudicar o crescimento e desenvolvimento renais interferindo possivelmente na função renal desses animais, regulando a expressão de genes envolvidos com atividade antioxidante. No entanto, esses autores apresentaram indicativos indiretos de comprometimento funcional renal nos neonatos. Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa mostrou que o hipotireoidismo materno, durante a gestação e lactação, foi capaz de reduzir o tamanho da ninhada e prejudicar os desenvolvimentos corporal e renal da prole, resultando em perda de função renal (COSTA et al, 2018). Desta forma, para dar continuidade a esse estudo e devido a escassez de dados sobre o assunto na literatura, este trabalho avaliou se o hipotireoidismo materno, induzido por metimazol, durante a gestação e/ou lactação, poderia resultar em alterações renais na prole jovem e adulta de ratas *Wistar*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as repercussões renais do hipotireoidismo materno, induzido nas fases somente de gestação e durante a gestação/lactação, para a prole jovem e adulta de ratas *Wistar*.

3.2 Específicos

Avaliar se os quadros de hipotireoidismo somente durante a gestação e na gestação/lactação podem alterar:

- a) os consumos hídrico e alimentar, bem como interferir no ganho de peso, maternos;
- b) os pesos corporal e renal da prole jovem e adulta de ratas *Wistar*;
- c) o perfil lipídico, função renal, excreção urinária de proteínas e pressão arterial sistólica da prole jovem e adulta de ratas *Wistar*;
- d) a quantificação do número de células renais em proliferação e a expressão de alfa actina, através de estudos imunohistoquímicos, na prole jovem e adulta de ratas *Wistar*,
- e) a arquitetura renal, avaliando as áreas dos corpúsculos renais (CR), tufos glomerulares (TG) e espaços capsulares (EC), através de estudos morfométricos, na prole jovem e adulta de ratas *Wistar*;
- f) os níveis plasmáticos de T3 e T4 na prole jovem e adulta de ratas *Wistar*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

A metodologia apresentada neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com protocolo registrado sob número CEUA/UFU 108/16 (Anexo).

Foram utilizados para acasalamento 20 ratas *Wistar* de aproximadamente 180g e 10 ratos *Wistar* de 300g, provenientes do Biotério Central da Rede de Biotério de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Esses animais foram alocados em caixas e separados por sexo no antigo Biotério da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM-UFU). No final de cada tarde, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos machos, numa proporção de 2 a 3 fêmeas para cada macho. No dia seguinte pela manhã, as fêmeas foram recolocadas em suas caixas originais e submetidas ao esfregaço vaginal para a constatação de uma possível gravidez, pela presença de espermatozoides no esfregaço.

4.2 Delineamento Experimental

As ratas grávidas foram separadas em caixas individuais e seus filhotes (fêmeas) divididos nos seguintes grupos:

CONTROLE (C): filhotes de **30** (n= 7) e **90** (n=7) dias de mães que beberam água normalmente durante a gestação até o período de desmame, cerca de 21 dias após a gestação.

EXPERIMENTAL 1 (E1): filhotes de **30** (n= 9) e **90** (n=9) dias de mães que receberam o metimazol, diluído na água filtrada (0,02%), desde o 8º dia de gestação até o nascimento da prole.

EXPERIMENTAL 2 (E2): filhotes de **30** (n= 9) e **90** (n=9) dias de mães que receberam o metimazol, diluído na água filtrada (0,02%), desde o 8º dia de gestação até o período de desmame, cerca de 21 dias após a gestação.

No quinto dia pós-parto foram coletadas amostras de sangue materno dos 3 grupos propostos para dosagem de hormônios T3 e T4, para confirmação dos quadros eutireoideo das ratas do grupo Controle e identificação da função tireoidiana materna dos grupos experimentais (E1 e E2). A dosagem desses hormônios também foi realizada nos filhotes de 90 dias de todos os grupos.

4.3 Coleta de rins, determinação da relação peso renal/peso corporal .

Após o nascimento, os filhotes fêmeas de 30 dias foram pesados, anestesiados com Halotano (*Cristália*) e tiveram seus rins retirados e também pesados para determinação da relação peso renal/peso corporal. Após a pesagem, os rins foram fixados em metacarn por 24 horas e deixados em álcool 70% até o momento da inclusão. Em seguida, os rins foram processados e incluídos em parafina para estudos posteriores.

Os animais de 90 dias dos grupos propostos, primeiramente foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e posterior coleta de sangue e urina para realização das dosagens de colesterol (CT), triglicerídeos (TGL), taxa de filtração glomerular (TFG) e excreção urinária de proteínas (EUP), para depois serem anestesiados também para coleta dos rins (como descrito acima). Os rins incluídos em parafina foram submetidos à realização de cortes de 5 µm de espessura, com auxílio de um micrótomo, para coloração com *Picrosirius red* para morfometria e estudos imunohistoquímicos.

4.4 Determinação do Perfil Lipídico

Os níveis de CT foram determinados, pelo método enzimático-Trinder e avaliado nos animais de 90 dias dos 3 grupos propostos (C: n=7, E1: n=9 e E2: n=9). Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra (RIFAI; WARNICK; DOMINICZAK, 2000).

Os TGL também foram determinados por método enzimático-Trinder nos animais de 90 dias dos 3 grupos propostos (C: n=7, E1: n=9 e E2: n=9). A lipoproteína lipase promove hidrólise dos TGL liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela enzima peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505nm. A intensidade da cor

vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de TGL na amostra (RIFAI; WARNICK; DOMINICZAK, 2000).

4.5 Determinação da PAS

A PAS foi avaliada de maneira indireta por pletismografia nos filhotes de 90 dias dos 3 grupos propostos (C: n=7 e E1: n=9 e E2: n=9). Antes da medida efetiva de PAS, os animais passaram por um período de habituação de 4 dias, com medida efetiva no 5º dia. Tanto para a habituação, quanto para a medida efetiva, os animais foram previamente aquecidos em uma câmara durante alguns minutos e, em seguida, submetidos à mensuração da PAS utilizando-se um manguito e um eletrodo, colocado diretamente na cauda desses animais. Os sinais captados foram amplificados pelo software *PowerLab (ADInstruments)* e convertidos pelo *LabChart 7 Pro (ADInstruments)* em valores de PAS em mmHg (FRANÇA, OLIVEIRA, BALBI, 2015).

4.6 Estudos de função renal

Para os estudos de função renal dos 3 grupos, os filhotes de 90 dias (C: n=7 e E1 e E2: n=9) foram colocados em gaiolas metabólicas durante 24 horas para adaptação. Em seguida, permaneceram por mais 24 horas para a coleta de urina, quando também foi coletada uma amostra de sangue, através de ordenhamento de cauda. Para determinação do *clearance* de creatinina e, conseqüentemente, da TFG, a dosagem de creatinina urinária e plasmática foi feita utilizando-se um método colorimétrico (YAN et al., 2014).

A EUP foi determinada nos filhotes de 90 dias dos 3 grupos (C: n=7 e E1 e E2: n=9) por colorimetria com o auxílio do vermelho de pirogalol (Labtest). Esta substância reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorbância resultante obtida pela leitura das amostras em espectrofotômetro é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra (MORAIS et al, 2018).

4.7 Dosagem de HT

Os níveis plasmáticos de hormônios T3 e T4 foram dosados em amostras de sangue coletadas das ratas no quinto dia pós-parto e nos filhotes de 90 dias dos grupos propostos, pela técnica de eletroquimioluminescência.

4.8 Estudos de Morfometria

As lâminas coradas com *Picrossirius red* foram fotografadas no microscópio Olympus do Laboratório de Registro de Imagens Histológicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e utilizadas para a análise morfométrica, que consistiu em determinação das áreas de corpúsculos renais, tufo glomerulares e espaço capsular, utilizando-se um software (HL Image ++ 97). Foram analisados 20 glomérulos por lâmina em fotografia, obtidos nas objetiva de 10x. As áreas pretendidas (corpúsculo renal, tufo glomerular e espaço capsular) foram medidas em micrômetros (MORAIS et al, 2018).

4.9 Estudos Imunohistoquímicos

Os cortes de tecido renal também foram submetidos à análise imunohistoquímica, sendo incubados com o anticorpo primário monoclonal, na diluição de 1/1000 :

- **anti-PCNA** (*Sigma Chemical Company*), durante 30 minutos em temperatura ambiente.

- **anti- α -SMA** (*Sigma Chemical Company*), overnight a 4°C.

Em seguida, os cortes foram submetidos a uma nova incubação, com anticorpo secundário anti-IEExperimental 1 de camundongo (1/200 – monoclonal – *Vector Laboratories*) durante 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi detectada com o sistema avidina-biotina peroxidase (*Vector Laboratories*), sendo que a adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Company*) juntamente com peróxido de hidrogênio permitiu o desenvolvimento de cor e a contracoloração foi feita com *metilgreen*.

4.10 Avaliação dos estudos imunohistoquímicos

A imunohistoquímica para o anticorpo anti- α -SMA foi avaliada analisando-se a porcentagem do glomérulo e/ou do compartimento tubulointersticial (TBI) renal marcado, atribuindo-se um escore de 0 a 4. O escore 0 equivale em 0 a 5% do campo marcado, o escore

1, entre 5 e 25%, o escore 2, entre 25 e 50%, o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100% (KLIEM et al., 1996). Já as reações de PCNA foram analisadas pela contagem de células positivas por glomérulo ou compartimento TBI renal. Foi determinado um escore ou número médio de células por compartimento glomerular e TBI para cada animal, sendo que análise foi realizada na lâmina inteira. Ambas as avaliações foram feitas utilizando um microscópio óptico na objetiva de 40x resultando na magnificação de 400x.

4.11 Análise estatística

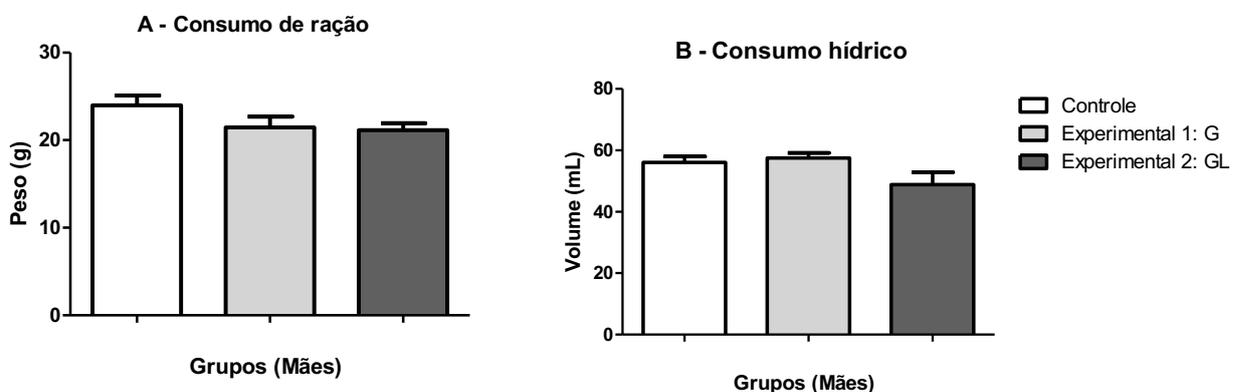
A análise estatística realizada no software *GraphPad Prism Version 5.00 (Trial)*. Primeiramente, verificou-se se os dados apresentavam ou não distribuição normal utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando apresentaram distribuição normal, utilizou-se um teste paramétrico para análise dos dados, senão, foi utilizado um teste não-paramétrico. Os testes utilizados para cada parâmetro estudado está citado em cada um dos gráficos da seção de Resultados. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

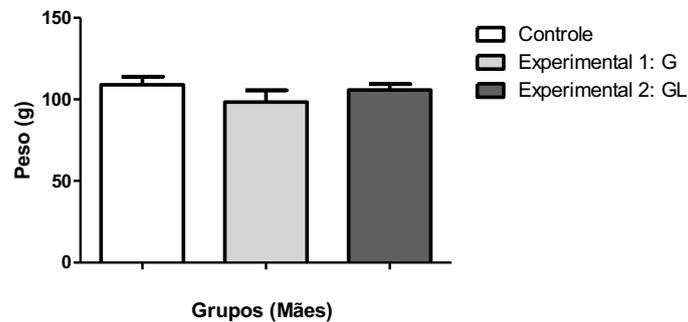
5.1 DADOS MATERNOS

Os consumos hídrico e alimentar maternos foram avaliados durante 5 dias ao longo da gestação, enquanto o peso corporal avaliado no início e no final da gestação. Não houve diferenças entre os grupos para os consumos de ração e de líquidos (**Figura 4**) e para a variação de peso durante a gestação (**Figura 5**).

Figura 4 – Consumos alimentar e hídrico maternos dos grupos C, E1 e E2.

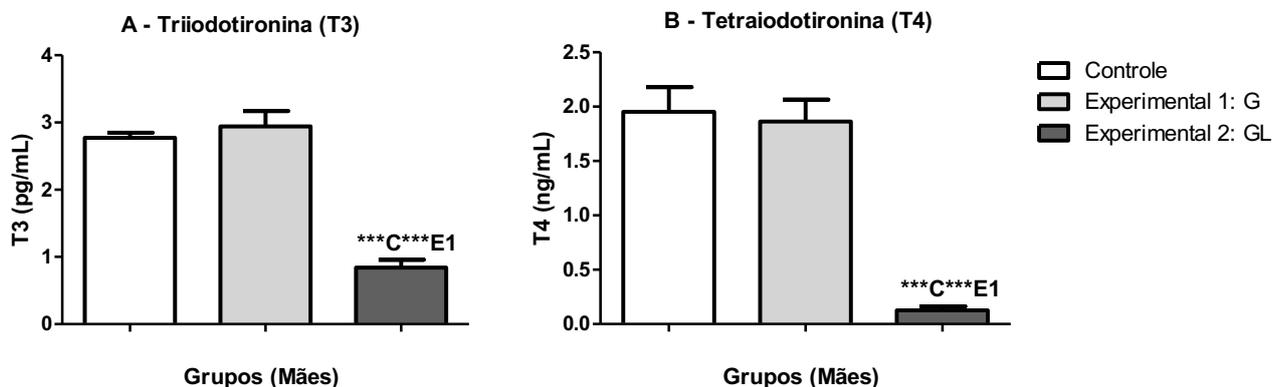


ANOVA com pós-teste de Tukey (C: n=7, E1: n=7 e E2: n=8). Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 5 – Variação de peso corporal materno durante a gestação dos grupos C, E1 e E2.

ANOVA com pós-teste de Tukey. (C: n=7, E1: n=7 e E2: n=8). Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A dosagem dos hormônios T3 e T4 foi feita em amostras de sangue maternas coletadas no 5º dia pós-parto, durante o período de amamentação. As mães de E2 apresentaram redução de T3 e T4, quando comparadas às mães dos demais grupos, demonstrando que o uso de metimazol durante a gestação e lactação resulta em quadro de hipotireoidismo materno e que esse quadro é revertido quando a droga é administrada somente durante a gestação, ou seja, as mães de E1 encontravam-se eutireoideas no período lactacional (**Figura 6**).

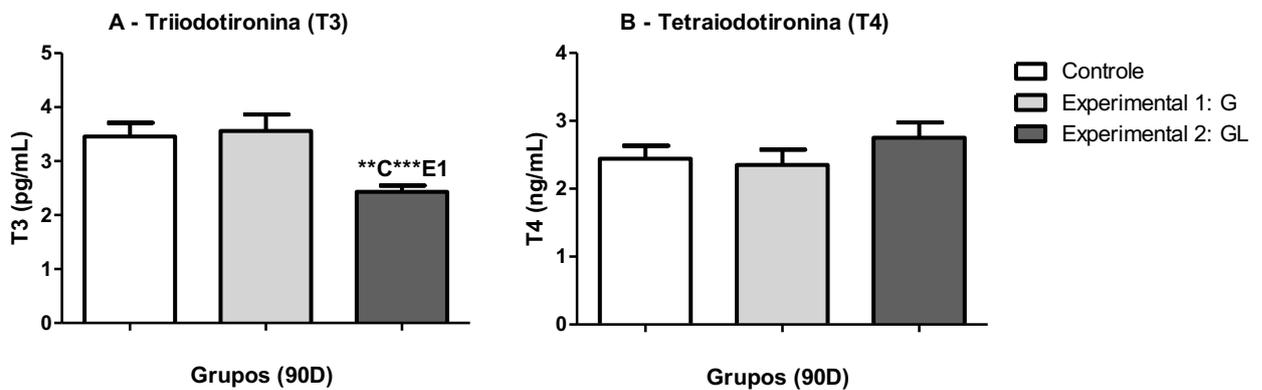
Figura 6 – Dosagens dos hormônios T3 e T4 das mães dos grupos C, E1 e E2 no 5º dia pós-parto.

ANOVA com pós-teste de Tukey. (C: n=7, E1: n=7 e E2: n=8). Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. ***C: $p < 0,001$ versus C; ***E1: $p < 0,001$ versus E1.

5.2 DADOS DA PROLE

A dosagem de T3 e T4 foi realizada também nos filhotes de 90 dias. Só foram observadas diferenças significativas para os níveis plasmáticos de T3, uma vez que os filhotes de E2 apresentaram redução desse hormônio, em relação aos filhotes dos outros grupos (**Figura 7**). Não houve diferenças entre os grupos para os níveis de T4, ou seja, os filhotes dos grupos experimentais não podem ser considerados hipotireoideos.

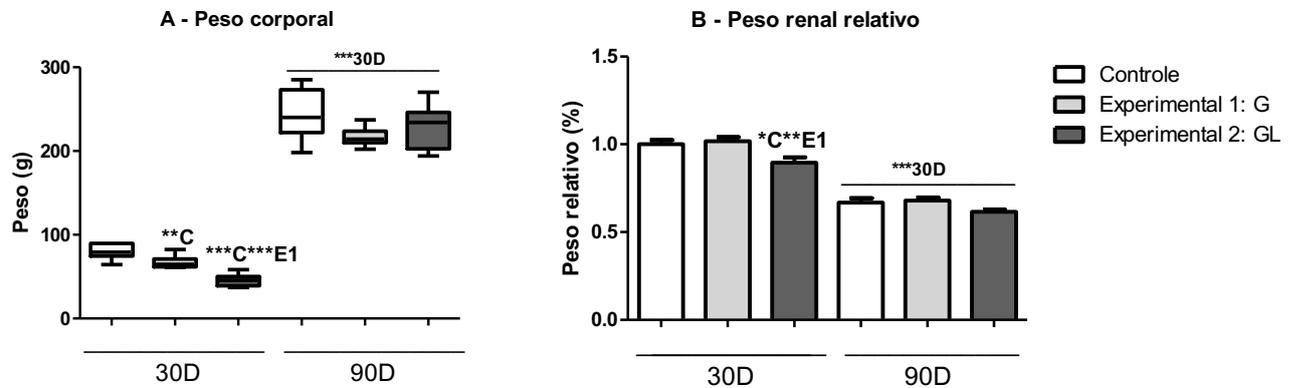
Figura 7 – Dosagens dos hormônios T3 e T4 dos filhotes de 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



ANOVA com pós-teste de Tukey [C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90) n=9]. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. **C: $p < 0,01$ versus C; ***E1: $p < 0,001$ versus E1.

Os filhotes de 30 dias de E1 apresentaram menor peso corporal do que os controles de mesma idade, enquanto que os de E2 também, quando comparados aos controles e E1. Já o peso relativo renal foi menor somente na prole de 30 dias de E2, em relação aos outros grupos, mostrando que o hipotireoidismo materno, durante a gestação e lactação, pode interferir com o desenvolvimento corporal e renal da prole.

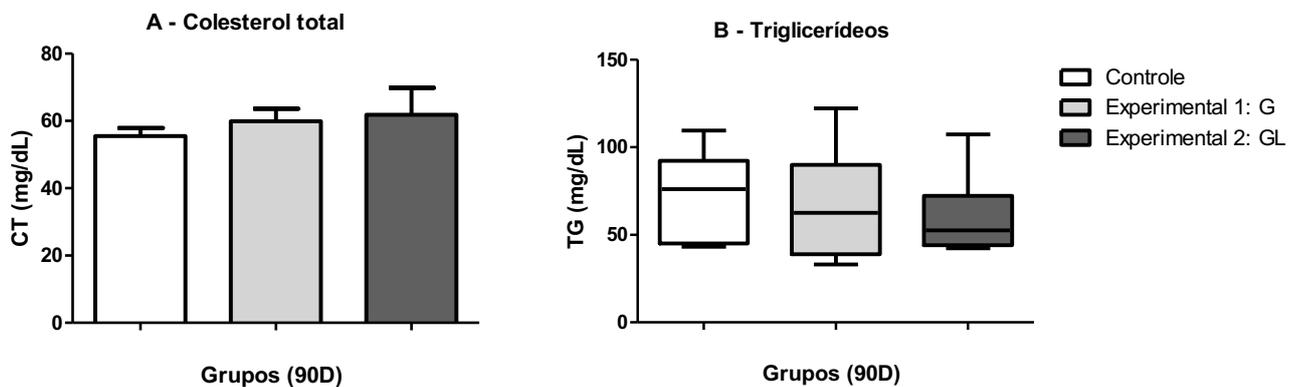
Figura 8 – Peso corporal e peso renal relativo dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



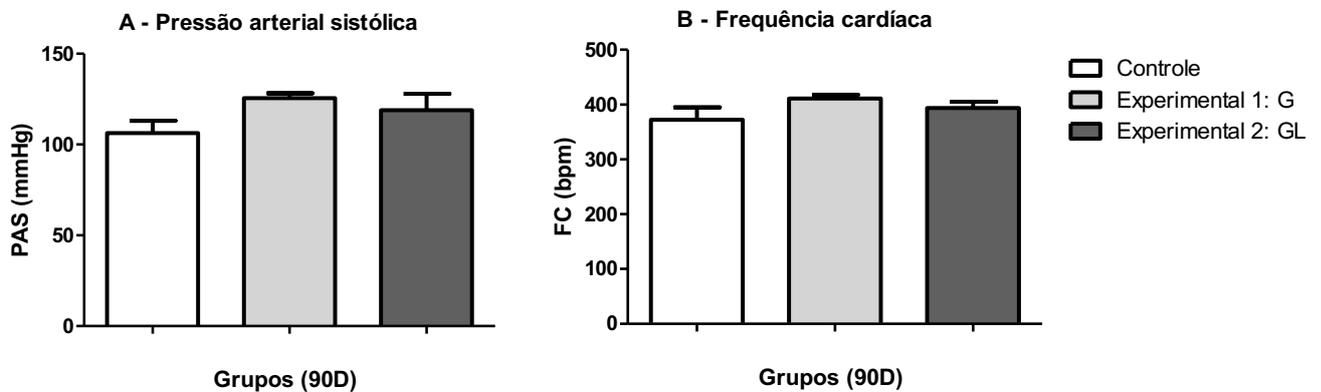
A - Peso corporal: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. B - Peso renal relativo: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. [C (30): n=7, E1 (30): n=9, E2 (30): n=9; C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C; ***E1: $p < 0,001$ versus E1; **E1: $p < 0,01$ versus E1; ***30D: $p < 0,001$ versus grupos de 30D.

Não houve diferenças entre grupos para os níveis plasmáticos de CT e TG (**Figura 9**), PAS e frequência cardíaca (**Figura 10**).

Figura 9 – Níveis plasmáticos de CT e TGL dos filhotes de 90 dias dos grupos C, E1 e E2.

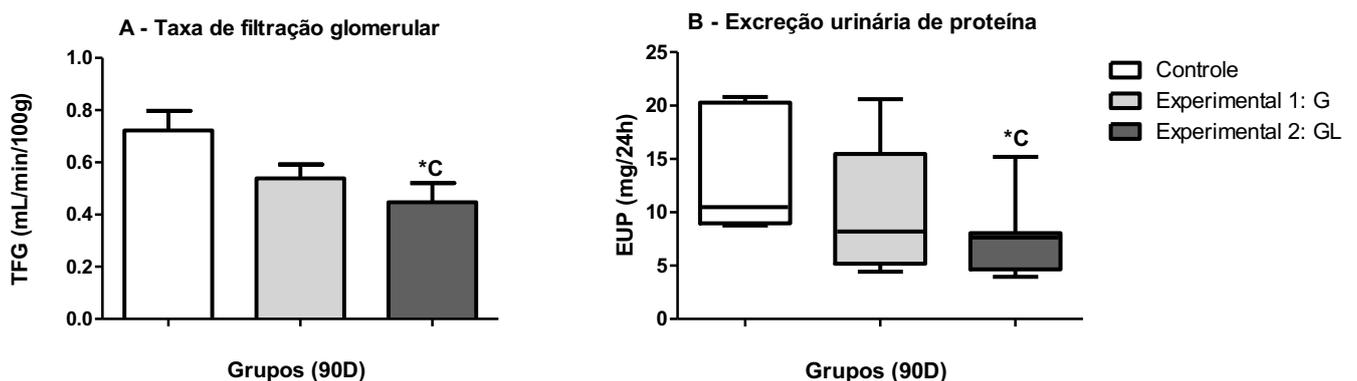


A - CT: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B - TGL: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. [C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Figura 10 – PAS e frequência cardíaca dos filhotes de 90 dias dos grupos C, E1 e E2.

ANOVA com pós-teste de Tukey [C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Pode-se perceber uma tendência de alteração da TFG e EUP nos grupos experimentais, embora somente os filhotes de 90 dias de E2 tenham de fato apresentado menores TFG e EUP, em comparação aos controles de mesma idade (**Figura 11**).

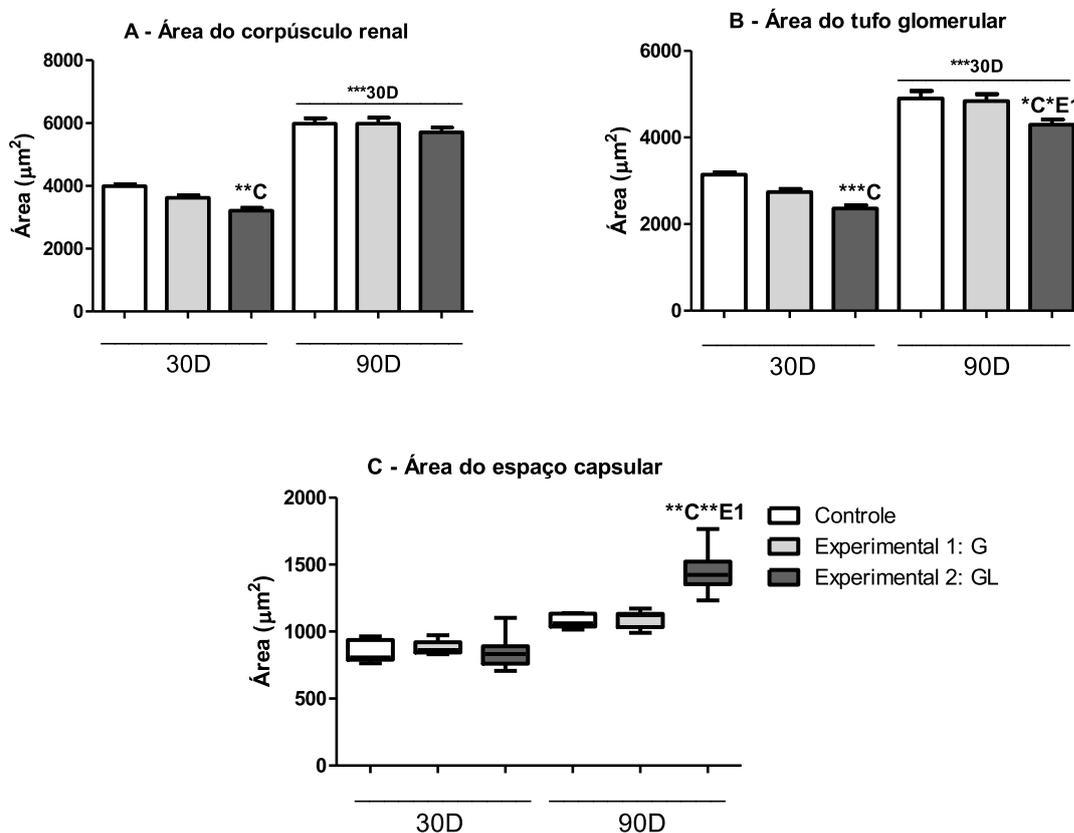
Figura 11 – Taxa de filtração glomerular e Excreção Urinária de Proteínas dos filhotes de 90 dias dos grupos C, E1 e E2.

A - TFG: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B - EUP: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25 [C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. *C: $p < 0,05$ versus C.

Quanto aos estudos morfométricos, observou-se que as áreas dos corpúsculos renais e tufo glomerulares aumentaram ao longo do tempo, sendo maiores em 90 dias quando

comparados aos 30 dias, mas os filhotes de 30 dias do grupo E2 apresentaram menores áreas de corpúsculo renal e tufo glomerular em relação aos controles. A alteração na área do tufo glomerular se manteve nos filhotes de 90 dias de E2, além do aumento do espaço capsular, quando comparados aos controles e E1. A alteração na arquitetura corpuscular, mais precisamente na área disponível para filtração, pode ter contribuído para o comprometimento da função renal na prole de E2.

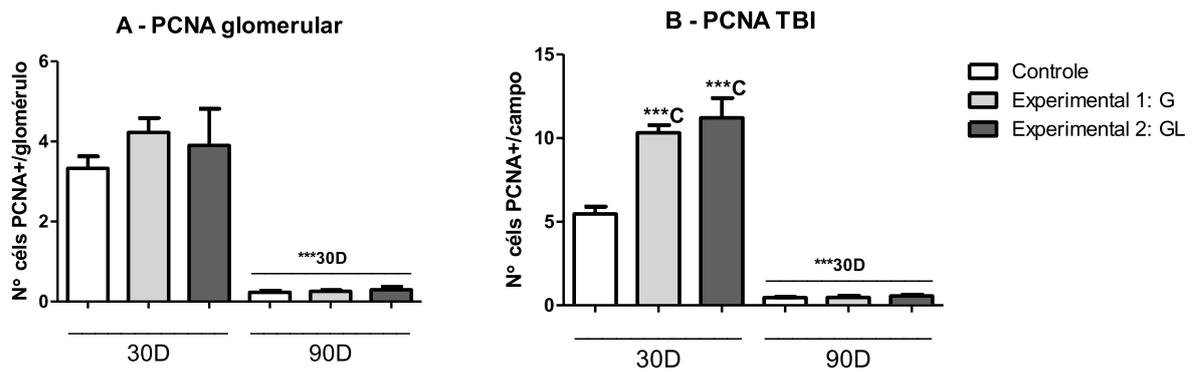
Figura 12 – Áreas do corpúsculo renal, tufo glomerular e espaço capsular dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



A e B - Áreas do corpúsculo renal e do tufo glomerular: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. C - Área do espaço capsular: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25 [C(30): n=7, E1 (30): n=9, E2 (30): n=9; C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. ***C: $p < 0,001$ versus C; **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C; **E1: $p < 0,01$ versus E1; *E1: $p < 0,05$ versus E1; ***30D: $p < 0,001$ versus grupos de 30D.

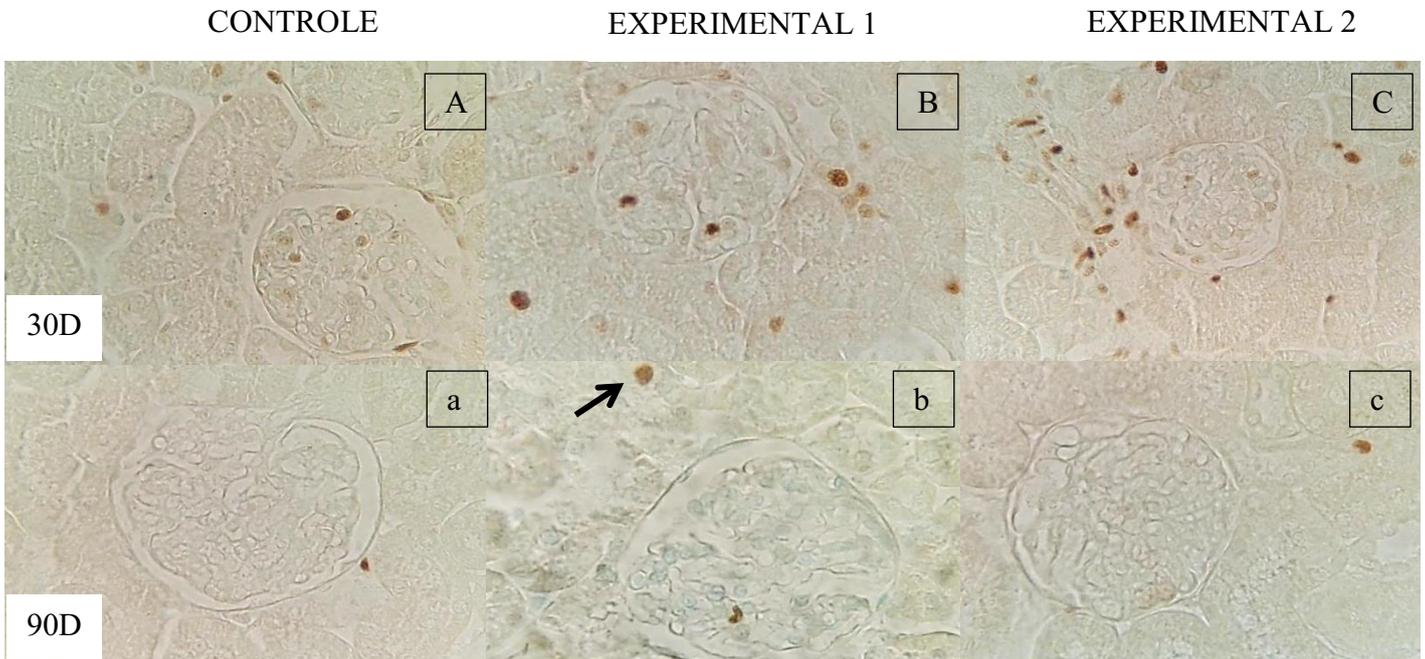
O número de células em proliferação foi avaliado pelo estudo imunohistoquímico para PCNA e foi maior no córtex renal dos animais de 30 dias quando comparados aos de 90 dias, ou seja, a proliferação celular diminui ao longo do tempo, mas nos animais de 30 dias dos grupos experimentais a proliferação no compartimento TBI foi mais evidente, em relação aos controles (**Figuras 13 e 14**). Já a alfa actina é um marcador de lesão renal e não foi diferente entre os grupos no compartimento glomerular, mas no compartimento TBI, a marcação para alfa actina foi maior em E2 quando comparado aos controles (**Figuras 15 e 16**).

Figura 13 – Avaliação do número de células em proliferação nos glomérulos e compartimento TBI do córtex renal dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



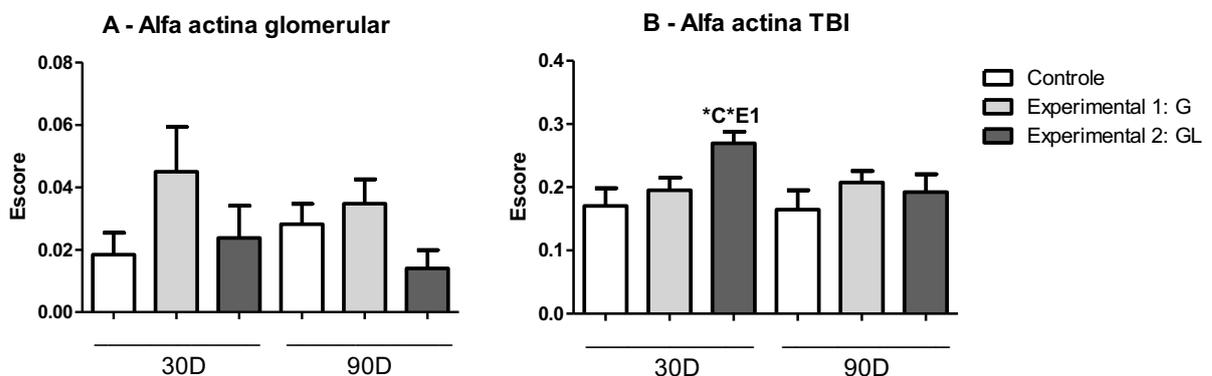
A e B – PCNA glomerular e TBI: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM [C (30): n=7, E1 (30): n=9, E2 (30): n=9; C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. ***C: $p < 0,001$ versus C; ***30D: $p < 0,001$ versus grupos de 30D.

Figura 14 – Marcação para PCNA nos glomérulos e compartimento TBI do córtex renal dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



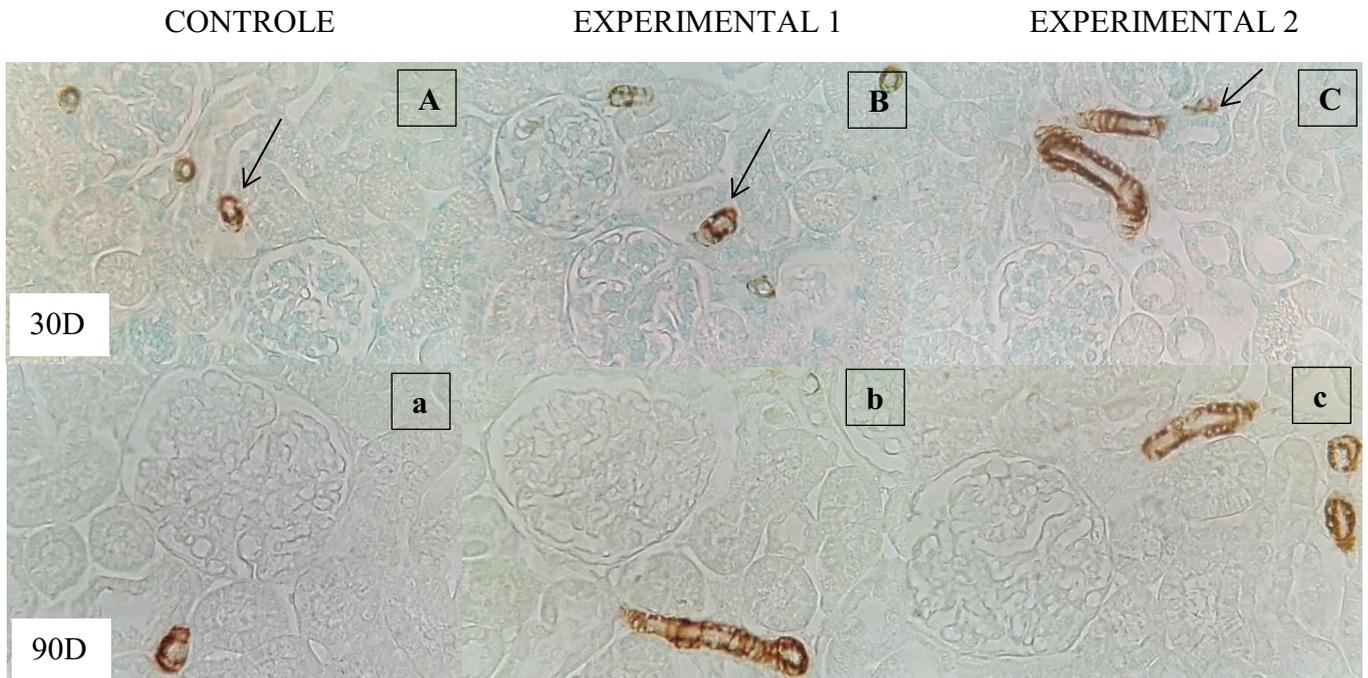
A, a: C de 30 e 90 dias; B, b: E1 de 30 e 90 dias e C, c: E2 de 30 e 90 dias, respectivamente. Notar maior número de células em proliferação no córtex renal dos animais de 30 dias (A, B e C), em relação aos de 90 dias (a, b e c), e no compartimento TBI dos animais de 30 dias de E1 e E2 quando comparados aos controles. Seta preta: célula em proliferação.

Figura 15 – Avaliação da expressão de alfa-actina glomerular e TBI do córtex renal dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



A – alfa actina glomerular: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B – Alfa actina TBI: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25 [C (90): n=7, E1 (90): n=9, E2 (90): n=9]. *C: $p < 0,05$ versus C, *E1: $p < 0,05$ versus E1.

Figura 16 – Marcação para alfa actina glomerular e TBI no córtex renal dos filhotes de 30 e 90 dias dos grupos C, E1 e E2.



A, a: C de 30 e 90 dias; B, b: E1 de 30 e 90 dias e C,c: E2 de 30 e 90 dias, respectivamente. Notar a expressão predominante de α -SMA na musculatura lisa dos vasos

6. DISCUSSÃO

Durante a gravidez, ocorre uma série de adaptações fisiológicas necessárias para o desenvolvimento e manutenção do feto, sendo a tireoide um exemplo de órgão que tem sua função modificada ao longo da gestação. Como resposta aos níveis plasmáticos aumentados de estrogênios na gravidez e os efeitos hepáticos desses hormônios, a concentração plasmática de TBG aumenta. Esse aumento interfere diretamente nos níveis plasmáticos de HT, ou seja, devido à redução de T3 e T4 livres, por uma maior ligação desses hormônios às proteínas plasmáticas, a tireoide aumenta a produção total de HT. A própria tireoide sofre influência da gonadotrofina coriônica (hCG) e tem seu tamanho aumentado nessa fase, uma vez que há homologia molecular entre TSH e hCG e também entre os receptores para esses hormônios. Além disso, uma elevada taxa de desiodinação placentária também pode interferir no metabolismo materno dos HT (GLINOER, 1997). Sendo assim, a função tireoidiana de mulheres saudáveis grávidas é diferente de mulheres saudáveis não grávidas. Além disso, dependendo da fase da gestação em humanos, as dosagens maternas de TSH, T3 e T4 (livres

e/ou total) podem variar justamente devido às adaptações pelas quais a glândula está sujeita nesta fase. No entanto, a caracterização detalhada dessas adaptações, bem como os níveis plasmáticos de TSH, T3 e T4 (livres e/ou total) de referência, ainda não foram bem estabelecidas durante a gestação de ratos *Wistar*.

Quando essas adaptações se estabelecem de maneira inadequada, a mulher pode desenvolver hipotireoidismo na gravidez, ou mesmo mulheres que já são portadoras desse distúrbio podem engravidar. O quadro de hipotireoidismo pode resultar em complicações obstétricas, como morte fetal intrauterina, hipertensão gestacional, descolamento de placenta e mau resultado perinatal. Alguns estudos indicaram que bebês nascidos de mães hipotireoideas apresentam maior risco de mortalidade perinatal e malformações congênitas e também há evidências de aumento da frequência de baixo peso ao nascimento e um potencial comprometimento psiconeurológico de longa duração na progênie (DAVIS, LEVENO, CUNNINGHAM, 1997; WASSERTRUM, ANANIA, 1995; LOWE, CUNNINGHAM, 1991; LEUNG et al, 1993).

Para tentar entender outros prejuízos que o quadro de hipotireoidismo materno possa provocar na prole, optou-se por induzi-lo em animais experimentais, utilizando-se metimazol diluído na água filtrada ofertada às mães, do 8º ao 21º dia de gestação (E1) e do 8º dia de gestação ao 21º de amamentação (E2), pois a tireoide em ratos aparece por volta do nono dia embrionário (DE9), quando a glândula já concentra TG no coloide e é capaz de realizar a captação de iodeto. A detecção hormonal tireoidiana no embrião de rato acontece já em DE9, com níveis diferentes de T3 e T4, sendo T3 o mais abundante e, até esse momento, a fonte hormonal do embrião é materna (KLEIN et al., 2001). O metimazol bloqueia a TPO, resultando em inibição direta da síntese de T4 e, conseqüentemente de T3 (MOOKADAM et al., 2005). Este modelo se mostrou efetivo, pois os níveis plasmáticos de T3 e T4 livres estavam reduzidos nas mães de E2, quando comparados aos demais grupos, enquanto que as mães de E1 tinham valores próximos às controles. Os dados do grupo E2 estão de acordo com os encontrados por Ben Amara (2011) e Rousseau; Buteau-Poulin; Kinkead (2019), que utilizaram a mesma droga e pelo mesmo período de tratamento. No presente trabalho, vale ressaltar que a dosagem foi feita em amostras de sangue maternas coletadas no 5º dia de lactação, sendo assim provavelmente as mães de E1 já tinham seu quadro revertido para eutireoidismo nesta data, enquanto as de E2 se mantiveram hipotireoideas, por ainda ingerirem metimazol. Estudos demonstraram que mesmo pequenas deficiências de iodo materno são capazes de diminuir os níveis de T4 do feto (KLEIN et al., 2001), evidenciando

que os níveis sorológicos normais maternos de T4 são fundamentais para a manutenção dos níveis adequados deste hormônio no embrião e uma adequada conversão local em T3.

Outros parâmetros maternos foram avaliados como os consumos hídrico e alimentar, bem como o ganho de peso no decorrer da gestação. O consumo de ração não foi diferente entre os grupos, como também foi constatado por López-luna e Morales (1985), mas em ratas grávidas hipotireoideas expostas à tireoidectomia. Karbalaie e colaboradores (2014) também avaliaram este parâmetro em ratas expostas ao metimazol, somente durante a gravidez, e não verificaram diferenças entre os grupos até o 13º dia, mas do 14º dia até o parto, o consumo foi menor no grupo hipotireoideo em relação ao controle. Neste trabalho, o consumo foi avaliado somente durante 5 dias de gestação, fato que pode explicar a diferença dos resultados encontrados. Também não foram constatadas diferenças entre os grupos para o consumo de líquidos, resultados que estão de acordo com Rousseau; Buteau-Poulin; Kinkead (2019), que só avaliaram ratas controles e tratadas com metimazol na gestação e lactação.

Com relação ao peso corporal, os resultados não foram diferentes entre os grupos. No entanto, um menor ganho de peso das mães com hipotireoidismo foi vista por Liu (2019), em ratas que receberam PTU, antes de engravidarem até o dia do parto. As diferenças podem ser explicadas pela droga utilizada para indução do hipotireoidismo e o tempo de exposição, pois PTU é cerca de 3 a 15% mais potente em ratos do que em humanos e mesmo assim ainda não é capaz de inibir totalmente os HT em roedores (GHANBARI; GHASEMI, 2017), além de ser mais hepatotóxico.

Em relação aos níveis hormonais da prole de 90 dias, encontrou-se uma redução de T3 no grupo E2 quando comparado aos demais, porém os níveis de T4 não foram diferentes entre os grupos, o que pode indicar uma menor conversão de T4 em T3 nesse grupo ou maior inativação de T3 em triiodotironina reverso (T3r). Serrano-Nascimento e colaboradores (2017) constataram menor atividade de Desiodinases tipo 1 no fígado e rins de filhotes machos de 90 dias de mães com hipotireoidismo, induzido por excesso de iodo na gestação/lactação. As desiodinases tipo 1 são responsáveis pela conversão de T4 em T3 na tireoide, rins e fígado, ou seja, pela maior parte do T3 circulante (GLINOER, 1997). Já Özgür e colaboradores (2016) observaram redução nos níveis de T3 e T4 de filhotes jovens, provenientes de mães tratadas com metimazol, somente na gestação e durante a gestação e lactação. Outros autores, Rousseau; Buteau-Poulin; Kinkead (2019) demonstraram que filhotes machos e fêmeas de 14 e 15 dias de idade de mães tratadas com metimazol, durante a gestação e lactação, também apresentaram redução nos níveis de T4. Por outro lado, Liu e

colaboradores (2019) não constataram diferenças nos níveis de T4 nos filhotes machos de 4 e 8 semanas de idade de mães hipotireoideas, tratadas com PTU antes e durante a gestação. Essa divergência dos dados encontrados pode ser explicada pela idade dos filhotes em que as dosagens de T3 e T4 foram feitas, uma vez que nos trabalhos citados foram estudados animais jovens e machos enquanto nesse, em fêmeas adultas. De acordo com o desenvolvimento da tireoide em roedores, os níveis totais de T3 e T4 aumentam significativamente no dia embrionário 18 (DE18) até o nascimento, pelo amadurecimento da glândula. Após o nascimento, os níveis plasmáticos de T4 sobem de forma acentuada até atingirem um pico no décimo sétimo dia pós-natal (DPN17), seguidos por uma elevação, em paralelo, dos níveis de T3, que irão atingir seu pico em DPN28. Os níveis totais de T3, que serão padrão em ratos adultos, são alcançados em DPN40 (FISHER et al., 1976; FISHER; KLEIN, 1981; WALKER; DUBOIS; DUSSAULT; 1980).

O crescimento e desenvolvimento foram comprometidos nos filhotes de 30 dias dos grupos experimentais, principalmente nos filhotes de E2, em que as mães foram expostas ao metimazol por maior período de tempo. Özgür e colaboradores (2016) também evidenciaram em seus experimentos o mesmo déficit de crescimento e desenvolvimento da prole, provenientes de mães expostas ao metimazol, desde a gravidez até o término da lactação e apenas durante a lactação. Da mesma forma, Santos e colaboradores (2012) registraram redução de peso corporal dos filhotes de 14, 21, 30 e 60 dias de mães com hipotireoidismo, quando comparados aos controles, mas administrando metimazol às ratas grávidas somente durante a gestação (do 9º dia até o parto). Esse déficit de crescimento pode ser explicado pela importância que os HT têm no desenvolvimento e crescimento da prole principalmente no período gestacional e início do período pós-natal.

Quanto ao perfil lipídico da prole, não houve diferenças entre os grupos para os níveis plasmáticos de CT e TGL, ao contrário dos achados de López-Luna e Morales (1985), que encontraram níveis aumentados de lipídeos totais em fetos de ratas tireoidectomizadas, durante a gestação. Há vários trabalhos na literatura sobre alterações no perfil lipídico de ratas grávidas hipotireoideas, mas muito poucos abordando o tema na prole dessas ratas. De qualquer forma, Hapon e colaboradores (2007), estudando as repercussões do hipotireoidismo materno induzido por PTU na composição do leite, encontraram redução drástica de TGL no leite, devido à diminuição da síntese de TGL hepática e nos níveis de TGL circulantes maternos, que, juntamente com a absorção mamária reduzida de ácidos graxos causados pela diminuição da expressão de lipase lipoproteica e, possivelmente diminuição da lipogênese

mamária, resultaram em uma diminuição da produção mamária de TGL. Os autores acreditam que o crescimento prejudicado das ninhadas das mães hipotireóideas possa ser atribuído em grande parte à baixa qualidade do leite juntamente com a sua ejeção prejudicada. Nesse contexto, é possível que o hipotireoidismo gestacional induzido por metimazol possa promover alterações similares e resultar nos dados encontrados para o peso corporal da prole de 30 dias, embora não tenha alterado o perfil lipídico desses animais aos 90 dias de idade.

Em relação aos níveis pressóricos, a PAS e frequência cardíaca, avaliada de maneira indireta por pletismografia nos animais de 90 dias, não foram diferentes entre os grupos estudados. No entanto, Santos e colaboradores (2012) avaliando por método direto via canulação arterial, mostraram que o hipotireoidismo experimental induzido por metimazol, exclusivamente durante a gravidez, aumentou a PAS, bem como a Pressão Arterial Média e a Pressão Arterial Diastólica e reduziu a frequência cardíaca na prole de 60 dias em condições basais. A diferença de técnica utilizada pode justificar a diferença de resultados encontrados, uma vez que o método direto é mais sensível e específico quando comparado à pletismografia caudal.

Quanto aos dados de função renal da prole adulta, constatou-se redução da TFG e EUP nos animais de 90 dias de E2, em relação aos controles, além do peso renal relativo ter sido menor nos animais de 30 dias de E2, quando comparados aos demais grupos. Ben Amara e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos protetores do selênio na nefrotoxicidade induzida por metimazol, administrado do 14º dia de gestação até o 14º dia após o parto, e constataram que os filhotes de 14 dias de mães hipotireóideas (sem suplementação com selênio) apresentaram aumento da creatinina plasmática e redução do clearance de creatinina em comparação aos controles. Além disso, o selênio foi capaz de minimizar essas alterações, pois o grupo suplementado não apresentou essas alterações. Sabe-se que os HT afetam a massa funcionante renal (medida pela relação massa renal - massa corporal), pois essa relação é reduzida pelo hipotireoidismo e aumentada em quadros de hipertireoidismo (VARGAS et al 2006; MARIANE, BERNS, 2012). Além disso, crianças com hipotireoidismo congênito apresentam uma alta incidência de anormalidades renais (KUMAR et al, 2009), o que demonstra a importância dos HT, não só para o funcionamento, mas também para o desenvolvimento renal. É importante destacar que os HT regulam a atividade de receptores adrenérgicos e dopaminérgicos em células tubulares renais, além de afetarem o Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) (DELCOMPARE et al, 2001; PRACYK, SLOTKIN, 1991; VAAMONDE et al, 1975; SEGARRA et al, 2006). Nesse contexto, se há

alteração nos níveis de HT, podem ocorrer mudanças na atividade do SRAA, e ambos impactarem a TFG e, conseqüentemente, a perda de proteínas urinárias.

Para avaliação de possíveis alterações na arquitetura dos corpúsculos renais, foram realizados estudos de morfometria, que mostraram um aumento nas áreas dos corpúsculos renais e tufo glomerulares ao longo do tempo, o que já se esperava pelo próprio crescimento renal, mas os filhotes de 30 dias de E2 apresentaram menores áreas de corpúsculo renal e tufo glomerular que controles de mesma idade. A alteração na área do tufo glomerular se manteve nos filhotes de 90 dias de E2, além do aumento do espaço capsular, quando comparados aos controles e E1. Essa alteração na arquitetura corpuscular, mais precisamente na área disponível para filtração, pode ter contribuído para o comprometimento da função renal na prole de E2. Esses achados foram diferentes dos dados encontrados por Davis (1983), que estudou os rins de animais adultos portadores de hipotireoidismo induzido pela alimentação, devido à adição de aminotriazol, e não encontrou alterações nos volumes dos compartimentos dos nefros, apesar da redução de tamanho e peso renal, mas mudanças patológicas na estrutura glomerular já foram verificadas no hipotireoidismo como espessamento da membrana basal glomerular e expansão de matriz mesangial, o que pode contribuir para a redução da TFG (BRADLEY et al, 1982). No entanto, não há trabalhos na literatura que evidenciem análises renais mais aprofundadas na prole de mães hipotireoideas.

Ainda sobre as alterações renais, avaliou-se o número de células em proliferação, pela reação imunohistoquímica para PCNA, bem como a expressão de alfa actina, um marcador de lesão renal, na prole de mães hipotireoideas. Com esses estudos, observou-se uma redução na taxa de proliferação celular renal no decorrer do tempo, de 30 para 90 dias e ainda, que o número de células em proliferação foi maior no compartimento TBI dos grupos experimentais de 30 dias, quando comparados aos seus respectivos controles. Já Slotkin e colaboradores (2012) avaliaram o controle do desenvolvimento celular cardíaco e renal em ratos neonatos hipertireoideos, pela exposição ao tratamento com T3 nos primeiros 5 dias pós-natais ou hipotireoideos, quando as mães foram expostas ao PTU do 17º dia gestacional até o 5º dia pós-natal. A análise da proliferação celular foi feita do nascimento até a vida adulta pela avaliação de DNA total/tecido e o PTU levou a déficits primários no número de células, que foi de magnitude semelhante nos dois tecidos, mas persistiram um pouco mais no rim do que no coração. Canavam e colaboradores (1994) compararam ratos neonatos controles, hipo e hipertireoideos quanto ao crescimento do fígado, rins e diafragma. O hipotireoidismo foi induzido pela administração de PTU às mães, do final da gestação até a lactação, enquanto o

quadro de hipertireoidismo, tratando-se os neonatos por 3 dias com injeções de T4. Os autores encontraram que as taxas teciduais de síntese proteica diminuíram em resposta ao hipotireoidismo, com conseqüente retardo de crescimento dos três tecidos e do animal como um todo. Em contraste, os três tecidos do corpo responderam de maneira muito diferente à indução do hipertireoidismo. As taxas de renovação de proteínas renais também foram aumentadas, mas o resultado foi atrofia renal.

A marcação para alfa actina glomerular não foi diferente entre os grupos, mas aumentou no compartimento TBI dos animais de 30 dias de E2, em relação aos controles, evidenciando um possível comprometimento tubular. Os HT também influenciam a função renal neonatal. O *status* hormonal tireoidiano perinatal pode afetar as enzimas do metabolismo energético mitocondrial em células dos túbulos convolutos proximais. Nesses túbulos também já foi descrito um aumento da atividade do cotransportador de sódio-fosfato, do contratransportador sódio-hidrogênio (NHE) luminiais, bem como da bomba de sódio-potássio basolateral (ALCALDE et al, 1999; BAUM et al, 1998; NAKHOUL, THOMPSON, MCDONOUGH, 2000). Percebe-se então uma relação entre T3 e taxa de proliferação celular, assim como entre T3 e a expressão de alfa actina. Wang e Sun (2010) estudaram cultura de células de músculo liso da aorta de ratos, tratadas com doses diferentes de T3 por 40 horas. O tratamento com T3 foi responsável por aumentar de forma significativa a expressão de PCNA e alfa actina na cultura, mas não há relatos na literatura sobre a expressão renal de alfa actina na prole de mães hipotireoideas.

Sendo assim, o hipotireoidismo materno resultou em alterações na proliferação celular TBI nos animais de 30 dias e, de alguma forma, também em prejuízo tubular, quando o quadro foi mantido até a lactação, enquanto provocou mudanças morfológicas glomerulares importantes nos animais de 90 dias. Tomados em conjunto, esses resultados mostram uma intensificação de prejuízos renais na prole de ratas que se mantiveram hipotireoideas até a amamentação, o que pode ser explicado pelo fato do desenvolvimento renal, em ratos, ter início no período intrauterino, mas só finalizar no período pós-natal, cerca de 15 dias após o nascimento. É importante lembrar que os níveis de T3 estão reduzidos nos animais desse grupo e destacar que a conversão periférica de T4 em T3 está diminuída na insuficiência renal crônica, quando os níveis de T3 e T4 estão reduzidos, mas os de T3r normais (MOORADIAN, MORLEY, 1984).

Baixos níveis séricos de T3 estão associados a um mau prognóstico de pacientes com doença renal crônica (IGLEZIAS, DÓEZ, 2009). Notavelmente, já foi demonstrado que a

função renal é melhorada pelo tratamento com T3 em pacientes com insuficiência renal e hipotireoidismo grave (VAN WELSEM, LOBATTO, 2007) e que a administração diária de T3 por 4 semanas pode diminuir a excreção urinária de albumina e atenuar o acúmulo de colágeno e fibrose renal em um modelo de nefropatia diabética em camundongos (LIN; SUN, 2011).

7. CONCLUSÃO

O hipotireoidismo materno é capaz de programar alterações estruturais renais importantes na prole jovem de ratas *Wistar*, que podem resultar em perda de função renal na vida adulta. Essas alterações são mais evidentes quando o hipotireoidismo materno é mantido até o período da amamentação.

8. REFERÊNCIAS

ABUID, J. ; LARSEN, P.R. Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 54, n. 1, p. 201, 1974. (doi: 10.1172/JCI107744)

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018, p. 1158-1169 (capítulo Pâncreas Endócrino).

ALCALDE, A.I. et al. Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1544-1551, 1999. (doi:10.1210/endo.140.4.6658)

AMARA, I. B. et al. Protective effects of selenium on methimazole nephrotoxicity in adult rats and their offspring. **Experimental and toxicologic pathology**, 2011. (doi: 10.1016/j.etp.2010.04.007)

AMERICAN THYROID ASSOCIATION (ATA). 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. **THYROID**. 27, Number 3, 2017. (doi:10.1089/thy.2016.0457)

ARGUMEDO, G.S.; SANZ, C.R.; OLGUÍN, H.J. Experimental Models of Developmental Hypothyroidism. **Horm Metab Res**; 44: 79–85, 2012.(doi: 10.1055/s-0031-1297941)

BALUCAN, F.S.; MORSHED, S. A.; DAVIES, T.F. Thyroid autoantibodies in pregnancy: their role, regulation and clinical relevance. **Journal of thyroid research**, v. 2013, 2013. (doi: 10.1155/2013/182472.)

BASU, G.; MOHAPATRA, A. Interactions between thyroid disorders and kidney disease. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 16, n. 2, p. 204, 2012. (doi: 10.4103/2230-8210.93737)

BAUM, M. et al. Effects of thyroid hormone on the neonatal renal cortical Na⁺/H⁺ antiporter. **Kidney international**, v. 53, n. 5, p. 1254-1258, 1998. (doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00879.x)

BENTLEY, M.D.; et al. Visualization of three-dimensional nephron structure with microcomputed tomography. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 290, n. 3, p. 277-283, 2007. (doi.org/10.1002/ar.20422)

BERRY, D.C.; BOEXPERIMENTAL 1ESS, K.; JOHNSON, Q.B. Management of pregnant women with type 2 diabetes mellitus and the consequences of fetal programming in their offspring. **Current diabetes reports**, v. 16, n. 5, p. 36, 2016. (doi: 10.1007/s11892-016-0733-7)

BRADLEY, S. E. et al. Changes in glomerulotubular dimensions, single nephron glomerular filtration rates and the renin-angiotensin system in hypothyroid rats. **Life sciences**, v. 30, n. 7-8, p. 633-639, 1982. (doi:10.1016/0024-3205(82)90279-x)

BROWN, L. et al. Adrenoceptor-mediated cardiac and vascular responses in hypothyroid rats. **Biochemical pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 281-288, 1994. (doi:10.1016/0006-2952(94)90018-3)

BÜYÜKGEBİZ, A. Congenital hypothyroidism clinical aspects and late consequences. **Pediatric endocrinology reviews: PER**, v. 1, p. 185-90; 2003. (PMID:16444157)

CANAVAN, J.P. et al. Thyroid-induced changes in the growth of the Liver, Kidney, and Diaphragm of Neonatal Rats. **Journal of cellular physiology**, v. 161, n. 1, p. 49-54, 1994. (doi:10.1002/jcp.1041610107)

CAPOBIANCO, E. et al. Intrauterine programming of lipid metabolic alterations in the heart of the offspring of diabetic rats is prevented by maternal diets enriched in olive oil. **Molecular nutrition & food research**, v. 59, n. 10, p. 1997-2007, 2015. (doi.org/10.1002/mnfr.201500334)

CATTANI, D. et al. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 375, n. 1, p. 14-26, 2013. (doi: 10.1016/j.mce.2013.05.001)

COSTA V.A.A. et al. Consequências metabólicas e renais do hipotireoidismo materno para a prole de ratos *Wistar*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

COSTANTINI, F.; KOPAN, R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. **Developmental cell**, v. 18, n. 5, p. 698-712, 2010. (doi: 10.1016/j.devcel.2010.04.008.)

DAVIS, LE; LEVENO, KJ; CUNNINGHAM, FG. Hypothyroidism complicating pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 72, n.201, p.108–112, 1988. (PMID:3380497)

DAVIS, R.G. et al. Kidney structure in hypothyroidism. **The American journal of pathology**, v. 113, n. 1, p. 41, 1983. (PMID: 6624877)

DE ESCOBAR, G. M.; OBREGON, M. J.; DEL REY, F. E. Fetal and maternal thyroid hormones. **Hormones**, v. 26, n. 1-4, p. 12-27, 1987. (doi:10.1159/000180681)

DE MORAIS, R. B. et al. Mast cell population in the development of diabetic nephropathy: Effects of renin angiotensin system inhibition. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1115-1118, 2018.(doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.066)

DEL COMPARE, J.A. et al. Effects of thyroid hormone on the renal dopaminergic system. **Endocrine**, v. 15, n. 3, p. 297-303, 2001. (doi:10.1385/ENDO:15:3:297)

DOUSDAMPANIS, P. et al. The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease. **The International journal of artificial organs**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2014. (doi:10.5301/ijao.5000300)

EL NAHAS, A.M. et al. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. **Kidney international. Supplement**, v. 54, p. S23, 1996. (PMID:8731189)

FEKETE, C. ; LECHAN, R. M. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. **Endocrine reviews**, v. 35, n. 2, p. 159-194, 2013. (doi: 10.1210/er.2013-1087)

FISHER, D. A.; DUSSAULT, J.H.; SACK, J.; CHOPRA, I.J. "Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. **Recent Prog Horm Res**. 33: 59-116, 1976. (doi:10.1016/b978-0-12-571133-3.50010-6)

FISHER, D. A.; KLEIN, A.H. Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. **N Engl J Med**. 304(12): 702-12. 1981.(doi:10.1056/NEJM198103193041205)

FRANÇA-SILVA, N.; OLIVEIRA, N. D. G.; BALBI, A. P. C. Morphofunctional renal alterations in rats induced by intrauterine hyperglycemic environment. **Arch. Med. Sci.** 12: 1-9, 2015. (doi: 10.5114/aoms.2015.48220)

GANDHI, K. R.; CHAVAN, S. Revisiting the morphology of pelvicalyceal system in human cadaveric kidneys with a systematic review of literature. **Asian journal of urology**, v. 6, n. 3, p. 249-255, 2019. (doi: 10.1016/j.ajur.2018.12.006)

GARBER, J. R. et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. **Thyroid**, v. 22, n. 12, p. 1200-1235, 2012. (doi:10.4158/EP12280.GL)

GHANBARI, M; GHASEMI, A. Maternal hypothyroidism: An overview of current experimental models. **Life sciences**, v. 187, p. 1-8, 2017. (doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.012.)

GLINOER, D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 3, p. 404-433, 1997. (doi:10.1210/edrv.18.3.0300)

GUPTA, V. e LEE, M. Central hypothyroidism. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 15, n. Suppl2, p. S99, 2011. (doi: 10.4103/2230-8210.83337)

HALL, P. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms. **The Journal of pathology**, v. 162, n. 4, p. 285-294, 1990. (doi:10.1002/path.1711620403)

HAPON, M. B. et al. Reduction of mammary and liver lipogenesis and alteration of milk composition during lactation in rats by hypothyroidism. **Thyroid**, v. 17, n. 1, p. 11-18, 2007. (doi:10.1089/thy.2005.0267)

IGLESIAS, P.; DIEZ, J.J. Thyroid dysfunction and kidney disease. **European journal of endocrinology**, v. 160, n. 4, p. 503-515, 2009.(doi.org/10.1530/EJE-08-0837)

- IGNOTZ, R.A.; ENDO, T.; MASSAGUE, J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 14, p. 6443-6446, 1987. (PMID:3471760)
- JENA, S.; CHAINYB, G.B.N.; DANDAPAT, J. Hypothyroidism modulates renal antioxidant gene expression during postnatal development and maturation in rat. **Gen Comp Endocrinol** v. 178, p.8–18, 2012. (doi: 10.1016/j.yControleen.2012.03.012)
- JOHNSON, R. J. et al. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. **The Journal of clinical investigation**, v. 87, n. 3, p. 847-858, 1991. (doi:10.1172/JCI115089)
- KARBALAEI, N. et al. The possible mechanisms by which maternal hypothyroidism impairs insulin secretion in adult male offspring in rats. **Experimental physiology**, v. 99, n. 4, p. 701-714, 2014. (doi:10.1113/expphysiol.2013.073825)
- KC, K.; SHAKYA, S.; ZHANG, H. Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 14-20, 2015. (doi:10.1159/000371628)
- KLEIN, R. Z. et al Relation of severity of maternal hypothyroidism to cognitive development of Offspring. **J Med Screen**, v.8, n.1, p. 18-20, 2001.(doi:10.1136/jms.8.1.18)
- KOEPPE, B. M. e STANTON, B. A. **Berne y Levy. Fisiología**. Elsevier Health Sciences, 2012.
- KUMAR, J. et al. Increased prevalence of renal and urinary tract anomalies in children with congenital hypothyroidism. **The Journal of pediatrics**, v. 154, n. 2, p. 263-266, 2009. (doi: 10.1016/j.jpeds.2008.08.023)
- LEUNG, A.S. et al. Perinatal outcome in hypothyroid pregnancies. **Obstetrics and gynecology**, v. 81, n. 3, p. 349-353, 1993. (PMID: 8437784)
- LIN, Y.; SUN, Z. Thyroid hormone ameliorates diabetic nephropathy in a mouse model of type II diabetes. **Journal of endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 185-191, 2011. (doi.org/10.1530/JOE-10-0340)
- LIU, Z. et al. Impaired Glucose Metabolism in Young Offspring of Female Rats with Hypothyroidism. **Journal of diabetes research**, v. 2019, 2019. (doi: 10.1155/2019/4713906)
- LOPEZ-LUNA, P.; MORALES, S. Effect of the hypothyroidism on the levels of different metabolites in pregnant rats. **Revista española de fisiología**, v. 41, n. 3, p. 311-316, 1985. (PMID:4070760)
- LOUZADA, R. A.; CARVALHO, D. P. Similarities and differences in the peripheral actions of thyroid hormones and their metabolites. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 394, 2018. (doi: 10.3389/fendo.2018.00394)

LOWE, T.W.; CUNNINGHAM, F.G. Pregnancy and thyroid disease. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 34, n. 1, p. 72-81, 1991.(doi:10.1097/00003081-199103000-00011)

MARCINIAK, A. et al. Fetal programming of the metabolic syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 2, p. 133-138, 2017 (doi:10.1016/j.tjog.2017.01.001)

MARIANI, L.H.; BERNS, J.S. The renal manifestations of thyroid disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 1, p. 22-26, 2012. (doi: 10.1681/ASN.2010070766)

MÁRQUEZ, M. et al. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. **Anatomy and embryology**, v. 205, n. 5-6, p. 431-440, 2002. (doi:10.1007/s00429-002-0262-9)

MESTMAN, J.H.; GOODWIN, T.M.; MONTORO, M.M. **Thyroid disorders of pregnancy**. Endocrinology and metabolism clinics of North America, v. 24, n. 1, p. 41-71, 1995. (PMID:7781627)

MICHOS, O. Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 5, p. 484-490, 2009. (doi.org/10.1016/j.gde.2009.09.003)

MOLINA, P. **Fisiologia Endócrina**. Cap. 4, p.77.4ª edição. Editora McGraw-Hill-ARTMED. 2014.

MOOKADAM, M. et al. Anti-thyroid methimazole in an acidosis-induced retinopathy rat model of retinopathy of prematurity. **Mol Vis**, v. 2, n. 11, p. 909-915, 2005. (PMID:16280976)

MOORADIAN, A.D.; MORLEY, J.E. Endocrine dysfunction in chronic renal failure. **Archives of internal medicine**, v. 144, n. 2, p. 351-353, 1984. (PMID: 6365009)

MOORE, K. L.; PERSUAD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 536 p, 2008.

NAKHOUL, F.; THOMPSON, C.B.; MCDONOUGH, A.A. Developmental change in Na, K-ATPase $\alpha 1$ and $\beta 1$ expression in normal and hypothyroid rat renal cortex. **American journal of nephrology**, v. 20, n. 3, p. 225-231, 2000. (doi.org/10.1159/000013593)

NAWROTH, P. P. et al. Thyroid hormones and the function of the vascular endothelium. **Zeitschrift fur arztliche Fortbildung und Qualitätssicherung**, v. 98, p. 33-35, 2004. (PMID: 15255311)

ÖZGÜR, E. et al. The effect of congenital and postnatal hypothyroidism on depression-like behaviors in juvenile rats. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 439, 2016. (doi: 10.4274/jcrpe.3498.)

PRACYK, J. B.; SLOTKIN, T. A. Thyroid hormone differentially regulates development of beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase and ornithine decarboxylase in rat heart and kidney. **Journal of developmental physiology**, v. 16, n. 4, p. 251-261, 1991. (PMID: 1667405)

RIFAI, N.; WARNICK, G.R.; DOMINICZAK, M.H. (Ed.). **Handbook of lipoprotein testing**. Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2000.

ROUSSEAU, J.P.; BUTEAU-POULIN, A.; KINKEAD, R. Maternal thyroid hormone deficiency and cardiorespiratory disorder in rat pups. **Experimental neurology**, p. 112960, 2019. (doi: 10.1016/j.expneurol.2019.112960)

ROVET, J. F. The role of thyroid hormones for brain development and cognitive function. **Endocr Dev**, v. 26, p. 26-43, 2014 (doi: 10.1159/000363153)

SALA-ROCA, J. et al. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, n. 3, p. 643-650, 2002. (doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00718-9)

SANTOS, S. O. et al. Experimental gestational hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 170, n. 1, p. 36-41, 2012. (doi.org/10.1016/j.autneu.2012.07.004)

SCHEDL, A. Renal abnormalities and their developmental origin. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 10, p. 791-802, 2007. (doi:10.1038/nrg2205)

SEGARRA, A. B. et al. Influence of thyroid disorders on kidney angiotensinase activity. **Hormone and metabolic research**, v. 38, n. 01, p. 48-52, 2006. (doi:10.1055/s-2006-924978)

SERRANO-NASCIMENTO, C. et al. Maternal exposure to iodine excess throughout pregnancy and lactation induces hypothyroidism in adult male rat offspring. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017. (doi: 10.1038/s41598-017-15529-9.)

SIMEONI, U.; BARKER, D. J. Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 119-124, 2009. (doi: 10.1016/j.siny.2009.01.002)

SLOTKIN, T. A. et al. Thyroid hormone differentially regulates cellular development in neonatal rat heart and kidney. **Teratology**, v. 45, n. 3, p. 303-312, 1992. (doi:10.1002/tera.1420450309)

TUFRO-MCREDDIE, A. et al. Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 266, n. 6, p. F911-F918, 1994. (doi: 10.1152/ajprenal.00378.2009)

VAAMONDE, Carlos A. et al. Impaired renal tubular reabsorption of sodium in hypothyroid man. **Translational Research**, v. 85, n. 3, p. 451-466, 1975. (doi.org/10.5555/uri:pii:0022214375904096)

VAN WELSEEM, M. E.; LOBATTO, S. Treatment of severe hypothyroidism in a patient with progressive renal failure leads to significant improvement of renal function. **Clinical nephrology**, v. 67, n. 6, p. 391, 2007. (doi: 10.5414/cnp67391)

VANDERPUMP, M. P. J; TUNBRIDGE, W. M. G. **The epidemiology of thyroid diseases.** Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text, p. 398-406, 2005.

VARGAS, F. et al. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. **European Journal of Endocrinology**, v. 154, n. 2, p. 197-212, 2006. (doi:10.1530/eje.1.02093)

VARGAS-URICOECHEA, H.; BONELO-PERDOMO, A.; SIERRA-TORRES, C. H. Effects of thyroid hormones on the heart. **Clínica e Investigación en Arteriosclerosis**, v. 26, n. 6, p. 296-309, 2014.(doi: 10.1016/j.arteri.2014.07.003)

WALKER, P.; DUBOIS, J.D.; DUSSAULT, J.H. Free thyroid hormone concentrations during postnatal development in the rat. **Pediatr Res**. v.14, p.247-249, 1980. (doi:10.1203/00006450-198003000-00014)

WASSERSTRUM, N.; ANANLA, C.A. Perinatal consequences of maternal hypothyroidism in early pregnancy and inadequate replacement. **Clinical endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 353-358, 1995. (doi:10.1111/j.1365-2265.1995.tb02642.x)

ZALETEL, K.; GABERSCEK, S. Hashimoto's thyroiditis: from genes to the disease. **Current genomics**, v. 12, n. 8, p. 576-588, 2011. (doi: 10.2174/138920211798120763)

ZAMBRANO, E.; NATHANIELSZ, P. W. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. **Nutrition reviews**, v. 71, n.1, p. 42-54, 2013.(doi: 10.1111/nure.12068)

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Membrane initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sci**. v.89, p.507-514, 2011. (doi: 10.1016/j.lfs.2011.04.006)

ZIMMERMANN, M. B. The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 26, n. s1, p. 108-117, 2012. (doi: 10.1111/j.1365-3016.2012.01275.x.)



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeitos do hipotireoidismo materno para o desenvolvimento renal e ósseo pós-natais e suas repercussões na vida adulta da prole de ratos Wistar”, protocolo nº 108 /16, sob a responsabilidade de **Ana Paula Coelho Balbi** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **16 de dezembro de 2016**.

(We certify that the project entitled " Efeitos do hipotireoidismo materno para o desenvolvimento renal e ósseo pós-natais e suas repercussões na vida adulta da prole de ratos Wistar", protocol 108/16, under the responsibility of Ana Paula Coelho Balbi - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 16th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/02/2017. Término: 22/12/2017.
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	152
Peso / Idade	Adultos e filhotes /200g a 350g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Biotério
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 20 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU