

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

FERNANDA BUSNARDO DE OLIVEIRA

**“Avaliação dos parâmetros metabólicos e renais dos filhotes jovens de ratas
Wistar com hipertireoidismo: benefícios do Resveratrol”**

Uberlândia

2021

FERNANDA BUSNARDO DE OLIVEIRA

Avaliação dos parâmetros metabólicos e renais dos filhotes jovens de ratas
Wistar com hipertireoidismo: benefícios do Resveratrol

Dissertação de mestrado apresentada pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Área de concentração: Fisiologia Renal e Desenvolvimento Renal.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Coelho Balbi.

UBERLÂNDIA

2021

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

O48 2021	<p>Oliveira, Fernanda Busnardo de, 1993-</p> <p>Avaliação dos parâmetros metabólicos e renais dos filhotes jovens de ratas Wistar com hipertireoidismo: benefícios do Resveratrol [recurso eletrônico] : Tratamento materno com Resveratrol em ratas Wistar com hipertireoidismo traz benefícios na saúde da prole. / Fernanda Busnardo de Oliveira. - 2021.</p> <p>Orientadora: Ana Paula Coelho Balbi. Coorientador: Luiz Borges Bispo da Silva. 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.2021.245 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Citologia. I. Balbi, Ana Paula Coelho, 1976-, (Orient.). II. Silva, Luiz Borges Bispo da, 1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 576.3</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



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 002/2021, do PPGBC				
Data:	26/02/2021	Hora de início:	14h05	Hora de encerramento:	16h30
Matrícula do Discente:	11822BCE001				
Nome do Discente:	Fernanda Busnardo de Oliveira				
Título do Trabalho:	Avaliação dos parâmetros metabólicos e renais da prole de ratas Wistar com hipertireoidismo materno: benefícios do Resveratrol				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia dos Sistemas Cardiovascular e Renal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação dos parâmetros metabólicos, renais e cardiovasculares da prole de ratas Wistar com hipertireoidismo materno: benefícios do Resveratrol				

Reuniu-se de forma Virtual, pela Plataforma Google Meet, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Heloísa Della Coletta Francescato – USP/Ribeirão Preto; Karen Renata Nakamura Hiraki – UFU e Ana Paula Coelho Balbi – UFU**, 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):

Aprovada.

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 26/02/2021, às 16:33, 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 **Karen Renata Nakamura Hiraki, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/02/2021, às 16:34, 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 **Heloísa Della Coletta Francescato, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 16:36, 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 **2587381** e o código CRC **662D2998**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Carmem e Ricardo, que sempre me
incentivaram a seguir os meus sonhos.

A Dona Alzira, que me inspirou a ser uma mulher independente.
A Prof. Ana Paula Balbi, que me me ensinou preciosas lições de vida e me
contagiou com sua paixão pela profissão.

RESUMO

Distúrbios endócrinos na gestação podem programar doenças na vida adulta da prole. Sabe-se que o hipertireoidismo está associado a um aumento de estresse oxidativo e que o Resveratrol (RSV) é um polifenol com diversas ações benéficas no organismo, incluindo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do tratamento materno com RSV, durante a gestação, na prole jovem de ratas *Wistar* hipertireoideas. **Metodologia:** As filhotes fêmeas de 30 dias de idade foram divididas nos seguintes grupos: C (controle: filhotes de mães que receberam veículo via gavagem durante a gestação), C+R (controle + RSV: filhotes de mães tratadas com RSV, na dose de 100 mg/kg, durante a gestação), H (hipertireoidismo: filhotes de mães tratadas com hormônio T4, na dose de 250µg/kg, durante a gestação) e H+R (hipertireoidismo + RSV: filhotes de mães tratadas com hormônio T4, na dose de 250µg/kg, e RSV, na dose de 100mg/kg durante a gestação). Os parâmetros maternos avaliados foram: peso corporal durante a gravidez e ao final da lactação e dosagens de T3 e T4, creatinina plasmática e glicemia. Nos filhotes, foram analisadas: dosagens de T3 e T4, perfil lipídico (colesterol e triglicerídeos) glicemia e função renal (taxa de filtração glomerular ou TFG e excreção urinária de proteínas ou EUP); além do peso corporal e pesos relativos da tireoide, hepático, cardíaco e renal. Análises morfométricas e imunohistoquímicas renais e tireoidianas também foram realizadas. **Resultados:** Nas mães, foi observado um aumento nos níveis de T3 e T4 no grupo H, e uma reversão no aumento de T3 nas fêmeas H+R, tratadas com RSV. Nos filhotes, houve uma diminuição em T3, T4 e triglicerídeos no grupo H, quando comparados ao grupo C. O peso relativo cardíaco destes animais foi menor, quando comparado ao grupo C+R. As filhotes fêmeas de mães hipertireoideas apresentaram ainda diminuição na TFG e aumento de células PCNA positivas no compartimento tubulointersticial (TBI) do córtex renal, um aumento na expressão de alfa actina glomerular e no TBI, além de alterações morfométricas como aumento na área do tufo glomerular e redução da área do espaço capsular. Já na tireoide da prole observou-se alterações como redução da área do folículo, bem como da área e altura do epitélio folicular. O tratamento materno com RSV atenuou a maior parte das alterações encontradas na prole de mães hipertireoideas. **Conclusão:** O hipertireoidismo materno interferiu no metabolismo de triglicerídeos, além de ter provocado alterações renais e tireoidianas importantes na progênie, do ponto de vista estrutural e funcional, mas o tratamento materno com RSV foi capaz de amenizar esses efeitos na prole jovem de ratas *Wistar*.

Palavras-chave: Hipertireoidismo materno. Resveratrol. Desenvolvimento Renal.

ABSTRACT

Endocrine disorders in pregnancy can program diseases in the offspring's adult life. It is known that hyperthyroidism is associated with an increase in oxidative stress and that Resveratrol (RSV) is a polyphenol with several beneficial actions in the body, including anti-inflammatory and antioxidant effects. **Objective:** To evaluate the effects of maternal RSV treatment, during pregnancy, on the young offspring of hyperthyroid Wistar rats. **Methodology:** The 30 day-old female pups were divided into the following groups: C (control: pups from mothers who received a vehicle solution via gavage during pregnancy), C + R (control + RSV: pups from mothers treated with RSV, at the dose 100 mg/kg, during pregnancy), H (hyperthyroidism: pups of mothers treated with hormone T4, at a dose of 250µg/kg, during pregnancy) and H + R (hyperthyroidism + RSV: pups of mothers treated with T4 hormone, at a dose of 250µg/kg, and RSV, at a dose of 100mg/kg during pregnancy). The maternal parameters evaluated were: body weight during pregnancy and at the end of lactation, and the measurements of T3 and T4, plasma creatinine and blood glucose. In the offspring, the following parameters were analyzed: T3 and T4 measurements, lipid profile (cholesterol and triglycerides), blood glucose and renal function (glomerular filtration rate or GFR and urinary protein excretion or EUP); body weight and relative weights of thyroid, liver, heart and kidney. Renal and thyroid morphometric and immunohistochemical analysis were also performed. **Results:** In the dams, there was an increase in T3 and T4 levels in group H, and a reversal in T3 increase in H + R females treated with RSV. In the offspring, there was a decrease in T3, T4 and triglycerides in group H, when compared to group C. The relative cardiac weight of these animals was lower when compared to group C + R. Female pups of hyperthyroid mothers also presented a decrease in GFR and an increase in positive PCNA cells in the tubulointerstitial compartment (TBI) of the renal cortex, an increase in the expression of glomerular α -SMA and in TBI, in addition to morphometric changes such as an increase in the glomerular tuft area and a reduction of the capsular space area. Regarding the offspring's thyroid, several alterations were observed, such as reduction in the follicle area, as well as in the area and height of the follicular epithelium. Maternal RSV treatment attenuated most of the changes found in the offspring of hyperthyroid mothers. **Conclusion:** Maternal hyperthyroidism interfered with triglyceride metabolism, in addition to causing important renal and thyroid changes in the offspring, from a structural and functional point of view, but maternal treatment with RSV was able to mitigate these effects in the young offspring of Wistar rats.

Key-words: Maternal hyperthyroidism. Resveratrol. Kidney development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos.....	15
Figura 2- Reações envolvidas na geração do iodeto, MIT, DIT, T3 e T4.....	16
Figura 3- Regulação do eixo hipotálamo-pituitária-tireoide.....	18
Figura 4- <i>Polygonum cuspidatum</i> , grande fonte de Resveratrol (3, 4', 5-trihidroxistilbeno), assim como a casca da uva.....	24
Figura 5- Consumo materno de RSV e seus efeitos benéficos no metabolismo da prole.....	25
Quadro 1- Grupos experimentais.....	29
Figura 6- Design Experimental do Projeto.....	30
Figura 7- Análise morfométrica renal: (A) corpúsculo renal e (B) áreas delimitadas para análise morfométrica.....	32
Figura 8- Análise morfométrica da tireoide: (A) glândula tireoide, (B) a mesma imagem com zoom 2x, (C) folículo tireoidiano delimitado para a análise da área do folículo, área do coloide e área do epitélio e (D) medidas de altura do epitélio.....	33
Quadro 2- Escores atribuídos para as imunorreções de alfa actina no tecido renal.....	34
Figura 9- Peso corporal materno.....	37
Figura 10- Dosagens dos hormônios Triiodotironina - T3 (A) e Tiroxina - T4 (B) maternos.....	38
Figura 11- Glicemia (A) e Creatinina Plasmática (B) materna.....	39
Figura 12- Peso corporal da prole aos 30 dias de idade.....	40
Figura 13- Pesos relativos entre os órgãos e o peso corporal dos filhotes de 30 dias de idade: tireoide (A), rins (B), fígado (C) e coração (D).....	41
Figura 14- Dosagens dos hormônios T3 (A) e T4 (B) nos filhotes de 30 dias de idade.....	42
Figura 15- Glicemia (A), colesterol total (B) e triglicérides (C) dos filhotes de 30 dias de idade.....	43
Figura 16- Taxa de filtração glomerular (A) e excreção urinária de proteínas (B) dos filhotes de dias.....	44
Figura 17- Análise morfométrica renal: (A) área do corpúsculo renal, (B) área do tufo glomerular e (C) área do espaço capsular.....	45
Figura 18 - Análise morfométrica da tireoide: (A) área do folículo, (B) área do coloide, (C) área do epitélio e (D) altura do epitélio.....	46
Figura 19- Imunohistoquímica para PCNA nos rins e na tireoide. (A) PCNA glomerular, (B) PCNA TBI e (C) PCNA na tireoide.....	47
Figura 20- Imunohistoquímica para PCNA renal nos grupos C, C+R, H e H+R.....	48
Figura 21- Expressão de alfa actina glomerular (A) e no TBI (B) dos filhotes de 30 dias de idade.....	49
Figura 22- Imunohistoquímica para alfa actina renal nos grupos C, C+R, H e H+R.....	50
Quadro 3- Resumo dos dados maternos.....	51
Quadro 4- Resumo dos dados da prole.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosinadifosfato
α -SMA	Alfa Actina
ALT	Aspartato Aminotransferase
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AST	Alanina Aminotransferase
AT ₁ R	Receptor de Angiotensina I
AT ₂ R	Receptor de Angiotensina II
ATP	Adenosinatrifosfato
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Grupo Controle
C+R	Grupo Controle + Resveratrol
CEUA	Comitê de Ética em Utilização de Animais
D1	Desiodase do Tipo 1
D2	Desiodase do Tipo 2
D3	Desiodase do Tipo 3
DAB	Diaminobenzidina
DIT	Diiodotirosina
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EPM	Erro Padrão da Média

EUP	Excreção Urinária de Proteínas
FPR	Fluxo Plasmático Renal
H	Grupo Hipertireoidismo
H+R	Grupo Hipertireoidismo + Resveratrol
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O	Monóxido de Dihidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPT	Hipotálamo-Pituitária-Tireoide
I ⁻	Iodeto
I ₂	Iodo
ICBIM	Instituto de Ciências Biomédicas
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MIT	Monoiodotirosina
Na ⁺	Sódio
NADPH	Adeninadinucleotídeofosfato
NO	Óxido Nítrico
NIS	Simporte Sódio-Iodeto
O ²⁻	Superóxido
OONO ⁻	Peroxinitrito
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen

PR	Peso Relativo
PTU	Propiltiouracil
PVN	Núcleo Paraventricular
REBIR	Rede de Biotérios de Roedores
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RSV	Resveratrol
rT3	Triiodotironina Reverso
SRA	Sistema Renina Angiotensina
T2	Diiodotironina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBG	Globulina Ligadora de Tiroxina
TBI	Tubulointersticial
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio de Liberação de Tireotrofina
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TSH-R	Receptor do Hormônio Tireoestimulante
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. A glândula tireoide, hormônios tireoidianos e o eixo hipotálamo-pituitária-tireoide	15
2.2. Distúrbios da tireoide e modelos animais de hipertireoidismo.....	19
2.3. Hipertireoidismo e metabolismo de macronutrientes.....	20
2.4. Complicações cardiovasculares, renais e hepáticas no hipertireoidismo	20
2.5. Hipertireoidismo e estresse oxidativo	22
2.6. DOHaD e hipertireoidismo gestacional	23
2.7. Resveratrol	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Animais e design experimental	28
4.2. Tratamento materno	30
4.2.1. Modelo de hipertireoidismo materno.....	30
4.2.2. Tratamento com Resveratrol.....	30
4.3. Cirurgia para retirada da tireoide, coração, rins e fígado	31
4.4. Processamento histológico	31
4.5. Análise morfológica renal e tireoidiana	31
4.6. Imunohistoquímica.....	34
4.7. Dosagem de hormônios tireoidianos	35
4.8. Dosagem de colesterol total e triglicérides.....	35
4.9. Estudos de função renal.....	36
4.10. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Dados maternos	37
5.2. Dados da prole.....	40
5.2.1. Dados sobre o crescimento e desenvolvimento da prole.....	40
5.2.2. Dados hormonais e metabólicos.....	42
5.2.3. Dados sobre função renal.....	44

5.2.4. Dados de morfometria e imunohistoquímica: renal e tireoidiana	45
6. DISCUSSÃO	53
6.1 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO	70

1. INTRODUÇÃO

O período gestacional é caracterizado por importantes mudanças na secreção e na produção de hormônios, que auxiliam tanto na adaptação do organismo materno para o desenvolvimento fetal, quanto na organogênese *per se*. Durante a organogênese, os tecidos possuem alta plasticidade celular, que proporciona ao feto a capacidade de se adaptar ao ambiente em que ele se encontra. Distúrbios maternos de origem endócrina podem resultar em um ambiente intrauterino hostil, ocasionando adaptações fisiológicas e teciduais permanentes na prole. Este processo é definido como “*Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)*” ou “Origens Desenvolvimentistas de Saúde e Doença”. Nos anos 80, os pesquisadores BARKER e OSMOND desenvolveram um estudo epidemiológico de grande relevância para esta área, que demonstrou uma correlação positiva entre o peso dos bebês ao nascimento e o aumento do risco de doença coronariana na vida adulta (BARKER e OSMOND, 1988). Evidências recentes demonstram que DOHaDs estão relacionadas a possíveis alterações epigenéticas que ocorrem durante o processo de desenvolvimento (LANGLE-EVANS, 2014; MARCINIAK, et al. 2017; SUZUKI, et al. 2017).

No contexto de distúrbios endócrinos, o hipertireoidismo pode afetar múltiplos órgãos e sistemas, trazendo severas consequências para o indivíduo. Quando associado à gravidez, esta condição pode prejudicar o desenvolvimento do feto e contribuir para o surgimento de complicações metabólicas e renais na prole. Muitas dessas repercussões são resultado do aumento do estresse oxidativo no organismo, estimulado pelo hipertireoidismo.

O Resveratrol (RSV) é um polifenol presente na casca da uva, no mirtilo, no vinho tinto e na pele do amendoim. Diversos estudos indicam que este composto natural possui diversas ações cardioprotetoras, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (ZHENG et al, 2018; HOU et al, 2019). Os benefícios do consumo de RSV em humanos são bem elucidados, porém, suas ações no consumo durante a gestação ainda não foram bem descritas na literatura. Neste contexto, a proposta deste trabalho é avaliar os possíveis efeitos protetores do tratamento materno com RSV durante a gravidez na prole de ratas *Wistar* com hipertireoidismo. Este estudo busca avaliar os efeitos deste tratamento nos parâmetros metabólicos e renais da prole.

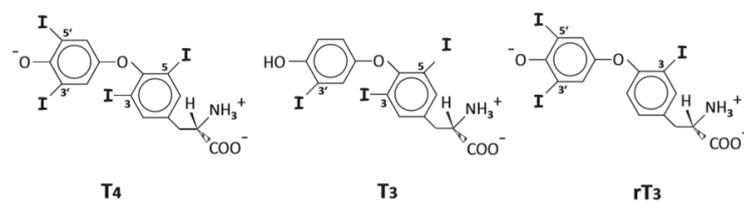
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A glândula tireoide, hormônios tireoidianos e o eixo hipotálamo-pituitária-tireoide

A glândula tireoide é composta por dois lobos, conectados por um istmo estreito e localizados ântero-lateralmente à traqueia. A glândula possui um importante suprimento vascular e é responsável pela produção de três hormônios: a triiodotironina (T3), a tiroxina (T4) e a calcitonina. O T3 é o hormônio em sua forma ativa, enquanto o T4 é produzido em maior quantidade, correspondendo à aproximadamente 90% da produção da tireoide. A tireoide também produz uma forma inativa do T3, denominado rT3 ou T3 reverso (Fig. 1). A calcitonina é produzida pelas células parafoliculares da glândula e está envolvida na regulação da concentração de cálcio no organismo (GUYTON e HALL, 2017; OSUNA et al, 2017; KÖHRLE et al, 2018).

Através da ação das enzimas desiodases, a maioria do T4 liberado na corrente sanguínea é convertido para a forma ativa (T3) através da remoção de um iodeto de sua estrutura molecular. Existem três tipos de enzimas desiodases, as dos tipos 1 (D1) e 2 (D2) são as principais responsáveis pela conversão de T4 para a sua forma ativa, enquanto a desiodase do tipo 3 (D3) atua na inativação do hormônio T3, convertendo-o em rT3 ou T2. Cerca de 95% dos hormônios T3 e T4 circulantes encontram-se ligados a globulina ligadora de tiroxina (TBG) ou a outras proteínas ligantes (MANCINI et al, 2016; OSUNA et al, 2017; KÖHRLE et al, 2018).

Figura 1- Estrutura molecular dos hormônios tireoidianos.



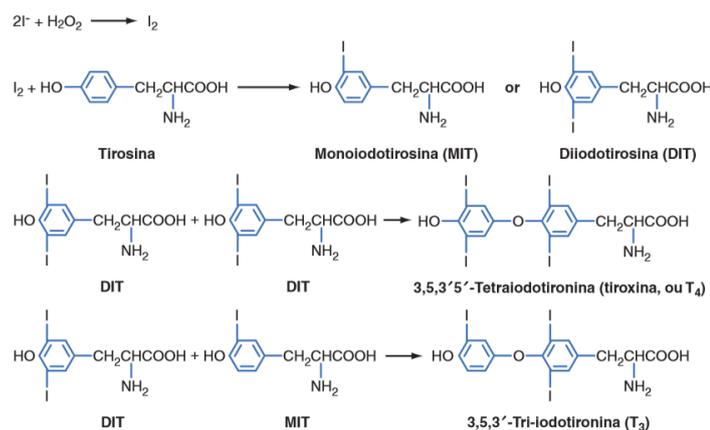
Fonte: Adaptado de Köhrle et al, 2018

A unidade funcional da glândula tireoide é o folículo tireoidiano, que é circundado por células epiteliais especializadas denominadas tireócitos (OSUNA et al, 2017). O íon iodeto (I^-) é essencial para a produção de hormônios tireoidianos e uma diminuição em no seu consumo alimentar pode trazer severas consequências para o organismo, como o bócio, caracterizado por um aumento significativo da glândula tireoide (COOPER et al, 2013; CARLÉ et al, 2014).

O iodeto é captado para o interior do tireócito através do transportador NIS (Simporte Na^+/I^-), localizado na membrana basolateral da célula. Uma vez no citoplasma, o iodeto é transportado para a porção apical do tireócito, onde ocorre o seu efluxo para o lúmen folicular através de canais iônicos específicos. Neste local, o iodeto sofre oxidação, reagindo com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo-se a iodo (I_2) e sendo rapidamente incorporado à moléculas de tirosina através da ação da enzima tireoperoxidase (TPO) (Fig. 2). O H_2O_2 é gerado pelas enzimas oxidases DuOx1 e DuOx2, da mesma família das NADPH oxidases (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016; GUYTON e HALL, 2017; RAZVI et al, 2018).

As moléculas de tirosina não se encontram livres no lúmen folicular, mas ligadas a uma proteína denominada tireoglobulina. A iodação de uma tirosina é responsável por formar as moléculas de monoiodotirosina (MIT) ou de diiodotirosina (DIT), conforme a quantidade de iodo incorporada. Deste modo, duas moléculas DIT são unidas para formar o T4 e/ou uma molécula de DIT e uma de MIT são acopladas para formar o T3 (Fig. 2) (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016; GUYTON e HALL, 2017; RAZVI et al, 2018).

Figura 2- Reações envolvidas na geração do iodeto, MIT, DIT, T3 e T4.

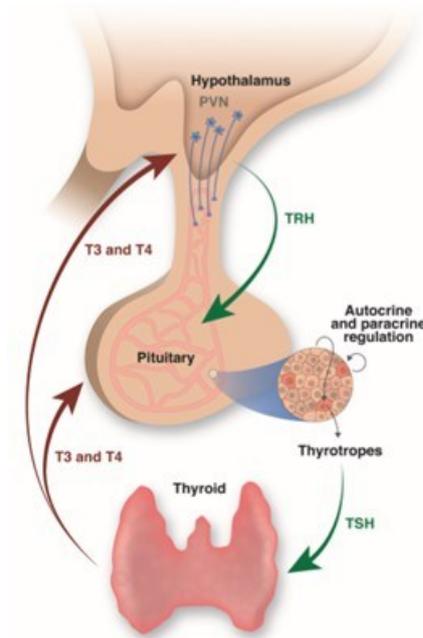


A secreção de hormônios tireoidianos é regulada por um eixo que envolve o hipotálamo e a pituitária (ou hipófise), e funciona como um sistema de retroalimentação, podendo estimular o desenvolvimento, a função e o crescimento da glândula tireoide. A pituitária anterior (ou adenohipófise) produz o hormônio TSH (hormônio tireoestimulante ou tireotrofina), cuja produção e liberação é regulada pelo TRH (hormônio de liberação de tireotrofina). O TRH é produzido e liberado por neurônios hipotalâmicos localizados na região do núcleo paraventricular (PVN). O PVN é composto por dois tipos de neurônios: os parvocelulares e os magnocelulares. Os neurônios parvocelulares também são conhecidos como hipofisiotróficos e são responsáveis pela liberação de TRH, que é transportado para a pituitária através de um sistema venoso portal (Fig. 3) (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016; ROSE e CHUANG et al, 2017).

Estudos *in vitro* e *in vivo* comprovam que o TRH induz um aumento dose-dependente na secreção de TSH, e em modelos de lesão hipotalâmica ou onde há dissociação entre o hipotálamo e a pituitária, ocorre uma diminuição significativa nos níveis séricos de TSH (MARTIN et al, 1970; FLORSHEIM, 1974; REES e SCANLON et al, 2014). Estudos em humanos observaram que uma injeção intravenosa de TRH é capaz de aumentar rapidamente os níveis de TSH circulantes, cerca entre 2 a 5 minutos após sua administração, possuindo um pico máximo entre 20 a 30 minutos e retornando aos níveis normais em cerca de 2 a 3 horas. Neste mesmo estudo, também foi observado um aumento de T3 e T4, com um pico de liberação entre o período de 3 a 8 horas após a administração de TRH (REES e SCANLON et al, 2014; ORTIGA-CARVALHO et al, 2016).

O TSH atua na regulação da diferenciação, função e crescimento da glândula tireoide através de sua ligação com os receptores TSH-R. Estes receptores estão acoplados a uma proteína G estimulatória e encontram-se localizados na membrana basolateral dos tireócitos. Este hormônio é responsável por estimular a expressão de proteínas essenciais para o funcionamento da tireoide, como por exemplo, o canal simporte NIS, a enzima TPO e a enzima DuOx1. Além da sua atuação a nível transcricional, o TSH também pode atuar aumentando a atividade do canal NIS e/ou estimulando sua inserção na membrana basolateral dos tireócitos (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016; ROSE e CHUANG et al, 2017).

Figura 3- Regulação do eixo hipotálamo-pituitária-tireoide.



Fonte: Ortiga-Carvalho et al, 2016

Receptores de hormônios tireoidianos encontram-se amplamente distribuídos no organismo e induzem diversas respostas genômicas e não genômicas. Deste modo, estes hormônios são capazes de regular o funcionamento de diversos sistemas fisiológicos, como por exemplo: o metabolismo energético, o sistema cardiovascular, o sistema nervoso, os órgãos reprodutores, as glândulas endócrinas, o metabolismo de nutrientes, entre outros, e quaisquer alterações na sua produção e liberação podem acarretar em severas consequências para o organismo (MULLUR et al, 2014; VARGAS-URICOECHEA et al, 2017).

2.2. Distúrbios da tireoide e modelos animais de hipertireoidismo

Alterações na síntese de hormônios tireoidianos podem causar distúrbios importantes no organismo, como o hipotireoidismo e o hipertireoidismo, que são considerados como “distúrbios primários da tireoide”. Em casos mais raros podem ocorrer distúrbios centrais, como alterações no hipotálamo e na pituitária, prejudicando a produção dos hormônios TRH ou TSH (ROSS et al, 2016; TAYLOR et al, 2018).

Clinicamente, o hipotireoidismo é caracterizado por níveis de TSH acima dos valores de referência e níveis de T4 livre abaixo do valor considerado como normal. Entretanto, as manifestações desta doença são muito variadas, de modo que formas subclínicas podem acometer indivíduos. Nestes casos, geralmente os níveis de TSH encontram-se acima dos valores de referência, porém os níveis de T4 livres apresentam-se como normais (TAYLOR et al, 2018).

O hipertireoidismo é considerado como uma forma de “tireotoxicose”, visto que os altos níveis de hormônios tireoidianos circulantes presentes neste quadro podem causar toxicidade nos tecidos. A prevalência global da doença varia entre 0,2 a 1,3%, e a maioria dos casos ocorre em mulheres. Clinicamente, este distúrbio é caracterizado por níveis de T4 livre acima dos valores normais associado a baixos níveis de TSH. Variações subclínicas da doença também podem ocorrer e o diagnóstico nestes casos é bastante complexo (ROSS et al, 2016; TAYLOR et al, 2018).

A forma mais comum de hipertireoidismo é a doença de Graves, que acomete cerca de 70-80% destes pacientes. Este distúrbio é caracterizado como uma doença autoimune, onde anticorpos são produzidos contra os receptores de TSH. Os sintomas mais comuns são bócio difuso, oftalmopatia e mixedema (ROSS et al, 2016; TAYLOR et al, 2018).

Vários estudos obtiveram sucesso no desenvolvimento de modelos animais de hipertireoidismo com a administração de L-tiroxina (T4) por diferentes vias de administração em roedores. Já foram constatados estudos que utilizam as vias intraperitoneal, subcutânea, intragástrica ou até diluída na água de beber destes animais (MONTIEL, et al, 1987; VARAS, et al, 2001; CARNEIRO-RAMOS et al, 2006; FERREIRA et al, 2006; AHMED et al, 2012). Os modelos animais desta doença apresentam características semelhantes às aquelas encontradas em humanos, como aumento nos níveis séricos de T4 e alterações a nível da pituitária-anterior (TSH), além de apresentarem consequências metabólicas, cardiovasculares e renais (AHMED et al, 2012).

2.3. Hipertireoidismo e metabolismo de macronutrientes

Os hormônios tireoidianos possuem grande influência no metabolismo de nutrientes, atuando principalmente na estimulação da síntese e degradação de lipídeos e proteínas. No caso do hipertireoidismo, os pacientes possuem um aumento de lipólise e proteólise, causando intensa perda de peso e de massa muscular. O metabolismo de glicose também se encontra aumentado nestes indivíduos, devido a uma intensa estimulação da neoglicogênese hepática (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016).

O excesso de hormônios tireoidianos circulantes também pode estimular o *turnover* de LDL (lipoproteínas de baixa densidade), deste modo, pacientes com hipertireoidismo geralmente apresentam uma diminuição nos níveis de colesterol. Além disso, os valores de HDL (lipoproteínas de alta densidade) destes pacientes podem encontrar-se normais ou diminuídos (DUNTAS et al, 2002; RIZOS et al, 2011).

2.4. Complicações cardiovasculares, renais e hepáticas no hipertireoidismo

Estudos indicam que aproximadamente 20% dos pacientes com hipertireoidismo apresentam quadros de fibrilação atrial (VARGAS-URICOECHEA et al, 2017). MITCHELL e colaboradores, em 2013, observaram que pacientes que apresentam insuficiência cardíaca associada a distúrbios na tireoide possuem um risco de mortalidade 60% maior quando comparados a pacientes eutireoideos.

O hipertireoidismo está associado a uma diminuição na resistência vascular sistêmica, podendo diminuir seus valores em até 50%. Cientistas defendem que este efeito pode ser uma consequência de alterações vasculares que favorecem a vasodilatação. Além disso, estudos em humanos e roedores com hipertireoidismo observaram um aumento na quantidade de capilares em tecidos musculares (CAPÓ e SILLAU, 1983; CELSING et al, 1986; VARGAS et al, 2006). Este aumento na densidade vascular pode estar acompanhado de um aumento no número de vasos arteriais de resistência, resultando em uma diminuição da resistência vascular. É importante ressaltar que o hipertireoidismo é caracterizado por um aumento no metabolismo tecidual, que também pode estar relacionado com um aumento na liberação de agentes vasodilatadores pela vasculatura (VARGAS et al, 2006; SYME et al, 2007). Além disso, a redução na resistência vascular sistêmica também pode diminuir os níveis de perfusão renal, ativando, conseqüentemente, o Sistema Renina Angiotensina (SRA) (BARRETO-CHAVES et al, 2010; OSUNA et al, 2017).

O SRA é essencial para manter a homeostase de sódio e eletrólitos do organismo, além de regular os níveis de pressão arterial do indivíduo. O primeiro passo após a ativação deste sistema é catalizado pela renina. A renina é uma aspartil transferase sintetizada nos rins, e é responsável por realizar a conversão de angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Além disso, a renina possui um importante papel no desenvolvimento renal, porém, os mecanismos envolvidos ainda não foram bem descritos. A Ang I, por sua vez, é convertida em angiotensina II (Ang II) por uma enzima do tipo endopeptidase endotelial, denominada enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II atua sobre os receptores AT₁R e AT₂R, e possui efeitos importantes em diversos tecidos, células e cascatas de sinalização. Nos rins, a Ang II é responsável por aumentar a reabsorção de sódio nas porções finais do nefro e causar um *feedback negativo* na liberação de renina (SPARKS et al, 2014; REIN e BADER, 2017).

Diversos outros fatores contribuem para o aumento da atividade do SRA no hipertireoidismo, como o aumento da atividade β -adrenérgica e o aumento da expressão de componentes envolvidos na atividade do SRA, como a renina, a Ang II e a ECA. Todas estas alterações são ocasionadas pelo aumento da concentração de hormônios tireoidianos circulantes (SPARKS et al, 2014; REIN e BADER, 2017).

Disfunções na tireoide podem acarretar em diversas alterações na função renal, que podem ocorrer em nível de fluxo plasmático renal (FPR), taxa de filtração glomerular (TFG), homeostase de eletrólitos, excreção urinária de proteínas (EUP) e morfologia dos rins. O hipertireoidismo é caracterizado por causar aumento na FPR e da TFG, e estas podem ser tanto consequências indiretas de ações dos hormônios tireoidianos no sistema cardiovascular, quanto ações diretas dos hormônios nos rins (BASU e MOHAPRATA, 2012; DOUSDAMPANIS et al, 2014). Ensaios clínicos mostram que a TFG de pacientes com hipertireoidismo pode aumentar entre 18 e 25%, quando comparados com pacientes eutireoideos (DEHOLLANDER et al, 2005; BASU e MOHAPRATA, 2012).

Estudos demonstram que o hipotireoidismo pode causar uma diminuição na relação peso do rim e peso corporal em modelos animais, enquanto o hipertireoidismo causa um aumento nesta razão (KOBORI et al, 1998; CARNEIRO-RAMOS et al, 2006). Os mecanismos envolvidos nas alterações renais causadas pelo hipertireoidismo ainda não foram bem descritos, entretanto, evidências mostram que mudanças na atividade do SRA pode ser a principal causa destas modificações (BARRETO-CHAVES et al, 2010; BASU e MOHAPRATA, 2012).

O hipertireoidismo também pode afetar a função hepática. Cerca de 39% dos pacientes hipertireoídeos possuem anormalidades nos níveis de alcalino fofatase, ASL (alanina aminotransferase) e ALT (aspartato aminotransferase) (LIN et al, 2017; MALESPIN et al, 2019). Em relação a alterações estruturais, análises histológicas de fígados de pacientes com hipertireoidismo demonstram acúmulo de gordura hepática e alterações hepatocelulares, como anormalidades nucleares e hipercromatismo (KLION et al, 1971; UPADHYAY et al, 2004; KHEMICHIAN e FONG, 2011).

2.5. Hipertireoidismo e estresse oxidativo

O estresse oxidativo possui um papel crucial na patogênese de diversas comorbidades, como hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão e arterosclerose. Esta desordem ocorre quando há um desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e/ou espécies reativas de nitrogênio (RNS), associado a um comprometimento dos mecanismos antioxidantes do organismo (YANG et al, 2010; RAVAROTTO et al, 2018). Dentre as ROS produzidas pelo organismo, temos o superóxido (O_2^-), que pode ser gerado pela cadeia respiratória mitocondrial, ou por diversas enzimas, como por exemplo, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) e a xantino oxidase. O superóxido possui uma meia-vida muito curta, porém é altamente reativo e pode interagir com vários compostos, como o óxido nítrico (NO), formando peroxinitrito ($OONO^-$), que é uma RNS potencialmente tóxica para o organismo (RAVOTTO et al, 2018; ZARKOVIC, 2020).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os hormônios tireoidianos atuam na regulação dos mecanismos antioxidantes do organismo. Os distúrbios da tireoide estão associados a um aumento de estresse oxidativo. No caso do hipotireoidismo, ocorre uma diminuição nos mecanismos antioxidantes, enquanto no hipertireoidismo, a principal causa de estresse oxidativo se dá pelo aumento da produção de ROS e RNS (RESCH et al, 2002; CHOUDHURY et al, 2003; WEYEMI et al, 2010; VENDITTI et al, 2013; MANCINI et al, 2016).

2.6. DOHaD e hipertireoidismo gestacional

Os hormônios tireoidianos possuem um papel importante no desenvolvimento fetal. Em humanos, a glândula tireoide é um dos primeiros órgãos endócrinos a ser desenvolvido, tornando-se ativo na 24^a semana de gestação. (MUNOZ et al, 2019).

Em ratos, considerando um período de gestação de 21 dias, a tireoide também é um dos primeiros tecidos endócrinos a ser desenvolvido, surgindo entre o 8^o e 9^o dia de gestação (NATHANIEL et al, 1986; NILSSON et al, 2017). Entretanto, a produção de hormônios tireoidianos fetal tem início somente no 17^o dia. Deste modo, grande parte do processo de organogênese depende da síntese de hormônios tireoidianos materno, que são capazes de atravessar a barreira placentária (NILSSON et al, 2017; MUNOZ et al, 2019). No nascimento, tanto a glândula tireoide quanto o eixo HPT ainda se encontram imaturos, e este processo torna-se completo somente no período juvenil, próximo ao 28^o dia após o nascimento (WALLING et al, 2016).

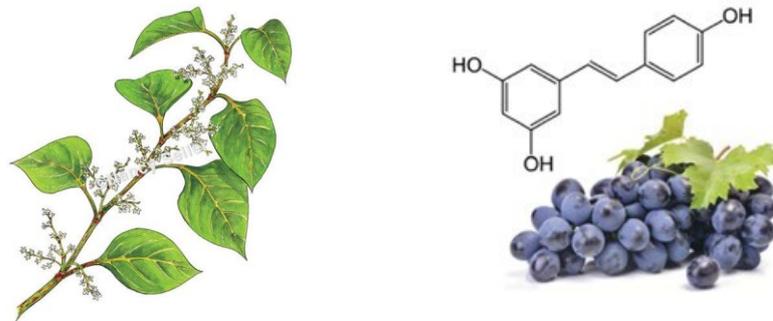
Fisiologicamente, em humanos, a concentração de hormônios tireoidianos encontra-se aumentada durante o primeiro trimestre de gravidez. Estudos indicam que este aumento está associado aos altos níveis de gonadotrofina coriônica humana (hCG) materna. Este hormônio possui uma estrutura parcialmente semelhante ao TSH, podendo interagir com seus receptores e aumentando, conseqüentemente, os níveis de T3 e T4 (RAMPRASAD et al, 2012; COOPER et al, 2013; STERRETT et al, 2019).

O hipertireoidismo gestacional está associado a severas conseqüências para o feto, como restrição do crescimento, taquicardia e falência cardíaca (MUNOZ et al, 2019). Na gravidez, sua prevalência é de 0,2% e 2,5% para a forma subclínica da doença. Nos Estados Unidos, estima-se que sua incidência seja de 5,9 a cada 1000 grávidas por ano (ROSS et al, 2016; TAYLOR et al, 2018). AHMED e colaboradores, em 2012, utilizaram um modelo animal de hipertireoidismo materno através do tratamento de ratas grávidas com L-tiroxina (T4), por via intragástrica. O tratamento teve a duração de 6 semanas, considerando todo o período gestacional e lactacional dos animais, e foram observadas diversas alterações na prole, como déficit no desenvolvimento neuronal e aumento de estresse oxidativo.

2.7. Resveratrol

O Resveratrol (3, 4', 5-trihidroxistilbeno, RSV) (Fig. 4) é um polifenol descrito primeiramente em 1939 por TAKAOKA, que isolou o composto da planta *Veratum grandiflorum*, muito comum na Ásia e na Europa. Atualmente, a literatura demonstra que o RSV também pode ser encontrado na casca da uva, em amendoins, amoras, e de uma forma mais abundante, na planta *Polygonum cuspidatum* (Fig. 5), comumente utilizada na medicina chinesa para o tratamento de doenças cardiovasculares (WANG et al, 2012; PANNU et al, 2019).

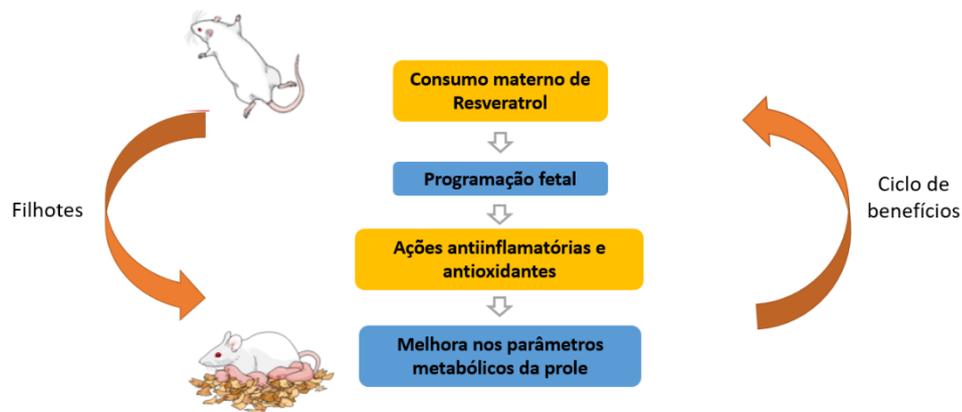
Figura 4- *Polygonum cuspidatum*, grande fonte de Resveratrol (3, 4', 5-trihidroxistilbeno), assim como a casca da uva.



Fonte: Zheng, 2018.

Estudos em modelos animais observaram que consumo materno de RSV pode atuar na DOHaD, trazendo efeitos benéficos para a prole através de suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes (Fig. 5) (ZHENG et al, 2018). Adicionalmente, SHEEN e colaboradores, no ano de 2018, observaram que o RSV mostrou efeitos benéficos em filhotes de ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, de mães tratadas com dieta hiperlipídica durante a gravidez e a lactação. Os resultados mostraram que o RSV induziu melhora nos seguintes parâmetros da prole: peso corporal e níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e leptina. Um aumento na taxa de sobrevivência da prole também foi observado.

Figura 5- Consumo materno de RSV e seus efeitos benéficos no metabolismo da prole.



Fonte: Adaptado de Zheng, 2018

Existem poucos trabalhos na literatura que investiguem o papel do RSV em disfunções da tireoide (OURIQUE et al, 2013; GIULIANI et al, 2014; FUJITA et al, 2017; GIULIANI et al, 2017; RAUF et al, 2017). Entretanto, estudos recentes têm mostrado que este composto apresenta efeitos antiproliferativos em linhagens tumorais de tireócitos. Estes efeitos foram chamados pelos autores de “efeitos anti-tireoide” (GIULIANI et al, 2017; RAUF et al, 2017). Outros estudos encontraram resultados semelhantes em células normais da glândula. GIULIANI e colaboradores, em 2014, utilizando modelos *in vitro*, com cultura de tireócitos de ratos normais tratados com RSV e *in vivo*, com ratos Sprague-Dawley eutireoideos também tratados com RSV, observaram diminuição na captação de iodeto associada a uma diminuição na expressão do gene que codifica o transportador NIS. É importante ressaltar que apesar destes resultados, não foi constatado um quadro de hipotireoidismo nestes modelos.

Substâncias com propriedades antioxidantes como a melatonina (MOGULKOC et al, 2005), a curcumina e a vitamina-E (SAHU e KASOJU, 2008) demonstraram efeitos benéficos no quadro de estresse oxidativo em modelos animais de hipertireoidismo. OURIQUE e colaboradores, em 2013, avaliaram o tratamento com RSV em ratos adultos com hipertireoidismo nos parâmetros oxidativos e na motilidade de espermatozoides. Foi observada uma melhora na peroxidação lipídica e nos mecanismos antioxidantes, além de efeitos benéficos na motilidade dos espermatozoides destes animais.

Estudos observaram que o RSV possui efeitos benéficos para os rins, podendo atuar como agente protetor em diversos modelos animais de injúria renal, como na nefropatia

diabética, na injúria renal causada por sepse, na lesão renal induzida por drogas, entre outras (AMARAL et al, 2008; PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2011; HOLTHOFF et al, 2012; KITADA et al, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento materno com RSV durante a gestação na prole jovem de ratas *Wistar* com hipertireoidismo.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento materno com RSV durante a gestação de ratas *Wistar* com hipertireoidismo, no que diz respeito a:

- Peso corporal materno durante a gestação e ao final do período lactacional;
- Glicemia materna ao final da gestação;
- Níveis de hormônios tireoidianos maternos ao final da gestação;
- Estudos de função renal (creatinina plasmática) maternos ao final da gestação;

Avaliar os efeitos do tratamento materno com RSV, durante a gestação, nas filhotes fêmeas de 30 dias de idade de ratas *Wistar* hipertireoideas, no que diz respeito a:

- Níveis de hormônios tireoidianos;
- Estudos de função renal (TFG e EUP);
- Níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicemia;
- Peso corporal e pesos relativos renal, da tireoide, cardíaco e hepático (relação entre peso dos órgãos e peso corporal);
- Análise morfométrica renal (áreas do corpúsculo renal, do tufo glomerular e do espaço capsular) e tireoidiana (áreas do folículo e do coloide, além da área e altura do epitélio folicular);
- Análise imunohistoquímica renal, utilizando-se marcadores de lesão e proliferação celular;
- Análise imunohistoquímica tireoideana, utilizando-se marcador de proliferação celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e design experimental

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos (250-300g) e 40 fêmeas (180-250g) provenientes da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos neste departamento separados por sexo, em caixas com maravalhas distribuídas em estantes climatizadas com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais (CEUA-UFU), pelo número do protocolo: 051/19 (ANEXO).

Os animais machos foram mantidos individualmente em suas caixas para reconhecimento de território e diariamente, no final da tarde, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos machos na proporção de 2 a 3 fêmeas para cada macho. No início da manhã do próximo dia foi realizado um esfregaço vaginal de cada rata para a verificação de uma possível gravidez pela presença de espermatozoides no esfregaço. Uma vez grávidas, as fêmeas foram colocadas em caixas individuais e receberam tratamentos específicos, descritos no tópico 4.2 deste trabalho. Após o período de desmame (21 dias após o nascimento), as filhotes fêmeas foram separadas das mães e divididas nos seguintes grupos:

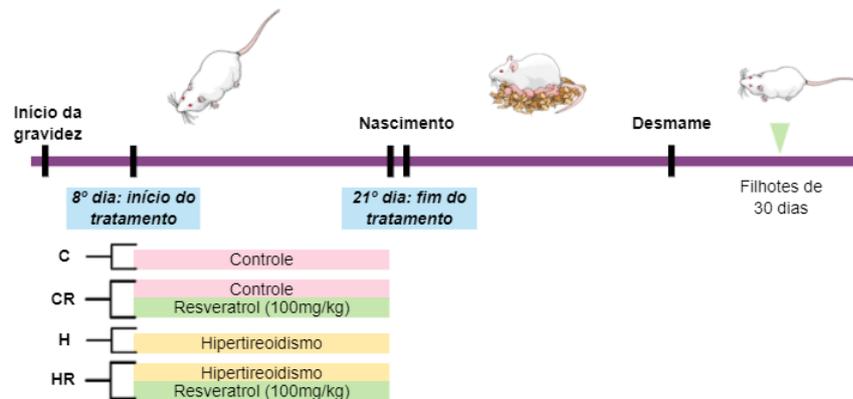
Quadro 1 – Grupos experimentais.

Grupo Controle (C)	Filhotes de 30 dias de mães que receberam veículo via gavagem durante a gravidez; filhotes (n=7), mães (n=6).
Grupo Controle + RSV (C+R)	Filhotes de 30 dias de mães tratadas com RSV (na dose de 100 mg/kg/dia) durante a gravidez; filhotes (n=7), mães (n=7).
Grupo Hipertireoidismo (H)	Filhotes de 30 dias de mães com hipertireoidismo materno que receberam veículo via gavagem durante a gravidez; filhotes (n=8), mães (n=6).
Grupo Hipertireoidismo + RSV (H+R)	Filhotes de 30 dias de mães com hipertireoidismo materno tratadas com RSV (na dose de 100 mg/kg/dia) durante a gravidez; filhotes (n=6), mães (n=8).

Fonte: A autora, 2021

O peso corporal das fêmeas grávidas foi avaliado nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 de gestação, e no 21º de lactação. Foi coletada uma gota de sangue na veia caudal das ratas grávidas ao 20º dia de gestação para avaliação da glicemia materna, que foi medida com o auxílio de um glicosímetro. Em seguida, foi coletada uma amostra de sangue para as dosagens plasmáticas de creatinina e hormônios tireoidianos.

Figura 6- Design Experimental do Projeto



Fonte: A autora, 2021

4.2. Tratamento materno

4.2.1. Modelo de hipertireoidismo materno

Em ratos, a tireoide começa a ser desenvolvida entre o 8-9º dia de gestação (NATHANIEL et al, 1986; NILSSON et al, 2017). A partir o 8º dia de gestação, as mães receberam o hormônio T4 (L tiroxina, na dose de 250µg/kg) diluído em solução de carboximetilcelulose 0.5% por via gavagem, e este tratamento ocorreu até o último dia de gestação, por volta de 8-9 horas da manhã (Adaptado de AHMED et al, 2012). Para confirmar os quadros de eutireoidismo nas ratas grávidas dos grupos C e C+R, e de hipertireoidismo nos grupos H e H+R, foram coletadas amostras de sangue pela veia caudal no 20º dia de gestação para a dosagem dos hormônios T3 e T4. Uma vez confirmados os quadros de eutireoidismo ou hipertireoidismo, estes animais passaram para a próxima etapa do estudo.

4.2.2. Tratamento com Resveratrol

O RSV possui uma meia-vida curta e suas propriedades farmacocinéticas não permitem que ele seja dissolvido em água (BAUR e SINCLAIR, 2006). Portanto, o RSV foi dissolvido em uma solução de carboximetilcelulose 0,5%, que também foi utilizada como veículo nos animais do grupo C (Adaptado de VEGA et al, 2016). A dose de RSV (trans-resveratrol, *Sigma-Aldrich*) administrada por animal foi de 100 mg/kg de peso corporal por dia, durante todo o período de gravidez, por volta de 8-9 horas da manhã. O método de administração foi via gavagem.

4.3. Cirurgia para retirada da tireoide, coração, rins e fígado

As filhotes fêmeas de 30 dias de idade foram anestesiadas e tiveram sua tireoide, coração, rins e fígado coletados para determinação do peso relativo desses órgãos (relação de peso dos órgãos/peso corporal), além das análises histológicas e de imunohistoquímica, que foram realizadas nos rins e na tireoide. No entanto, os animais de todos os grupos só passaram pelo processo cirúrgico após a realização de coletas de sangue e urina para as dosagens de glicemia, hormônios tireoidianos, colesterol total e triglicerídeos; análise da função renal; e EUP.

4.4. Processamento histológico

Após a coleta de órgãos, estes foram fixados em *Methacarn* por 24h, e posteriormente mantidos em álcool 70%. Em seguida, os tecidos foram colocados em cassetes identificados e passaram pelas seguintes etapas de processamento:

- Desidratação (sequência de álcoois em ordem crescente, de 70 a 100%)
- Diafanização (imersão em Xilol)
- Parafinização (banhados em parafina líquida, entre 56-60°C)

Posteriormente, os órgãos foram retirados dos cassetes e incluídos em blocos de parafina. Um micrótomo (*Lupetec*) foi utilizado para a secção dos tecidos em 5µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente gelatinizadas e mantidas em estufa, à 60°C, por 24h, para que houvesse a remoção do excesso de parafina.

4.5. Análise morfométrica renal e tireoidiana

As secções de tecido renal foram coradas com *Picrosirius Red* para as avaliações de morfometria. Para isso, as imagens das lâminas foram obtidas por meio de microscopia óptica digitalizada, em aumento de 200x, obtidas por meio do *software Opticam*. Foram selecionados 20 campos por lâmina e todos os glomérulos presentes nestes campos foram analisados. Os parâmetros morfométricos selecionados para este trabalho foram: área do corpúsculo renal, área do tufo glomerular e área do espaço capsular. Todas as medidas foram obtidas na unidade de µm², com auxílio do *software ImageJ*.

Figura 7- Análise morfométrica renal: (A) corpúsculo renal e (B) áreas delimitadas para análise morfométrica.

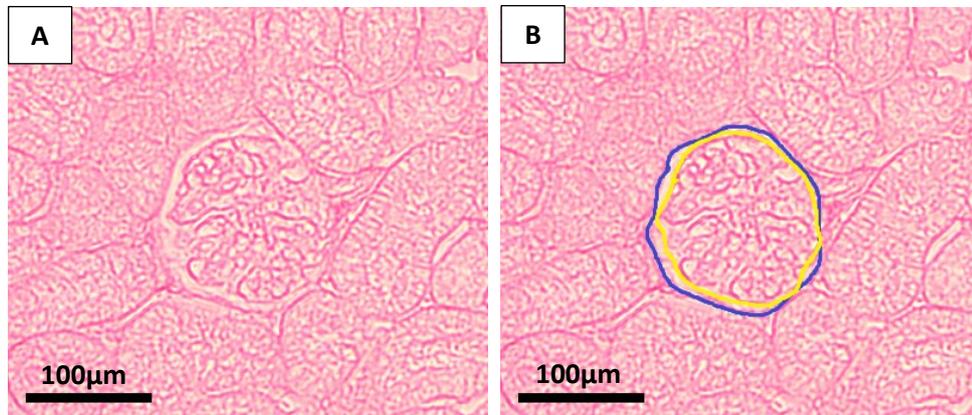


Figura 7 - Imagem demonstrativa da análise de morfometria renal, realizada no *software Image J*, de acordo com FRANÇA-SILVA e colaboradores, 2017. Em (A), um corpúsculo renal selecionado para a análise. Em (B), as delimitações feitas pela ferramenta *freehand tool* do software. Em azul, está delimitada a área do corpúsculo renal; em amarelo, está delimitada a área do tufo glomerular; e a diferença entre as duas áreas geradas pelo *software* resultou na área do espaço capsular. Coloração: *Picrossirius Red*. Aumento: 200x. Fonte: A autora, 2021.

As secções de tecido tireoidiano foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). As imagens das lâminas foram obtidas por meio de microscopia óptica digitalizada, em aumento de 200x, obtidas por meio do *software Opticam*. A análise morfométrica foi avaliada pelo *software ImageJ*, onde foram selecionados de 6 a 8 campos/imagens por lâmina. Os parâmetros avaliados foram: área do epitélio (μm^2), área folicular (μm^2), área do colóide (μm^2) e altura do epitélio (μm). A periferia da glândula tireoide possui uma cápsula de tecido conjuntivo e alguns vasos sanguíneos, que podem atrapalhar as análises descritas acima. Portanto, todos os parâmetros morfométricos foram avaliados na área central de cada lobo tireoidiano.

Figura 8- Análise morfométrica da tireoide: (A) glândula tireoide, (B) a mesma imagem com zoom 2x, (C) folículo tireoidiano delimitado para a análise da área do folículo, área do coloide e área do epitélio e (D) medidas de altura do epitélio.

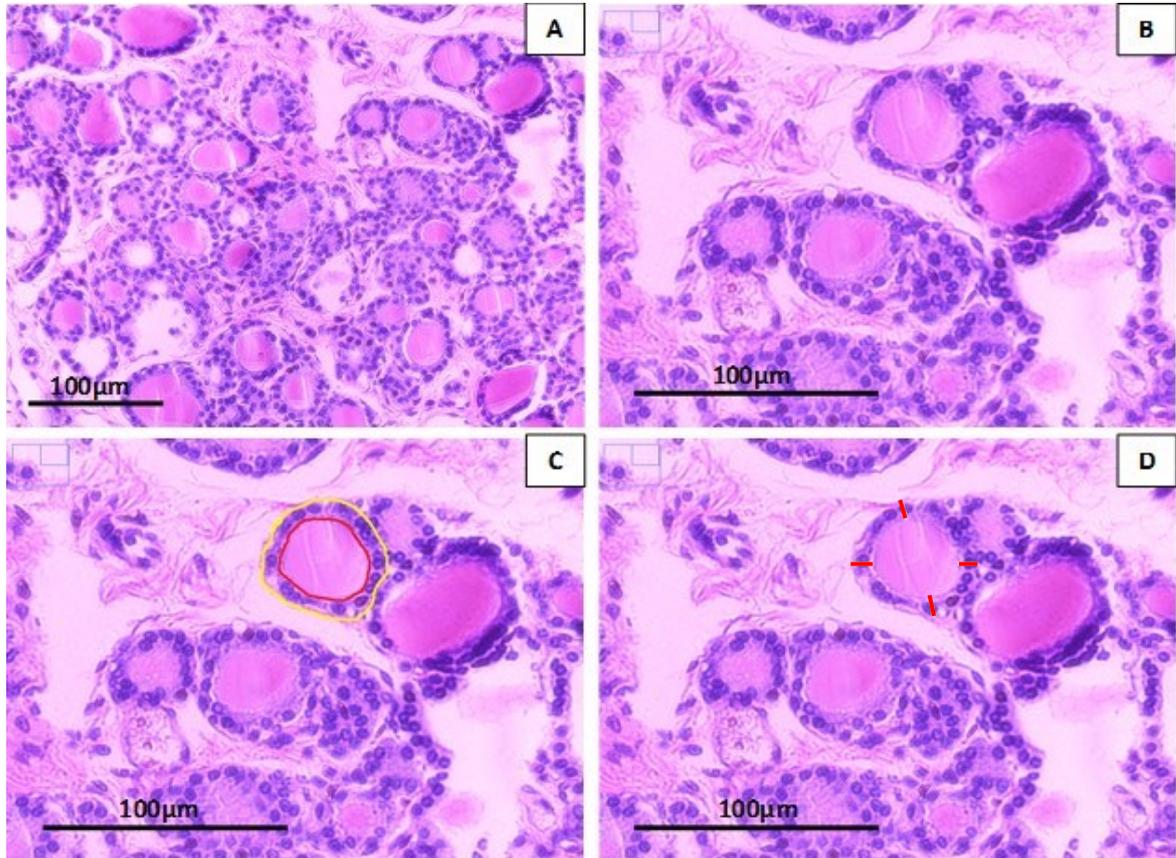


Figura 8 - Imagem demonstrativa da análise de morfometria da tireoide, realizada no *software ImageJ*, adaptado de RODRIGUES-PEREIRA e colaboradores, em 2019. Em (A), a glândula tireoide, em aumento de 200x. Em (B), temos a mesma imagem com zoom em 2x, para melhor visualização do folículo. Em (C), as delimitações feitas pela ferramenta *freehand tool* do *software*. Em amarelo, está delimitada a área do folículo; em vermelho, está delimitada a área do coloide; e a diferença entre as duas áreas geradas pelo *software* resulta na área do epitélio. Em (D), as análises de altura do epitélio, onde foram traçadas 4 retas em pontos diferentes do folículo (que podem ser visualizadas na cor vermelha). As retas foram traçadas da superfície basal até a superfície apical das células foliculares, e o *ImageJ* gerou o comprimento de cada reta. A média aritmética das 4 retas traçadas em cada epitélio de cada folículo corresponde a altura do epitélio. Coloração: H&E. Aumento: 200x. Fonte: A autora, 2021.

4.6. Imunohistoquímica

Secções de tecido tireoidiano e renal foram desparafinizadas para a técnica de imunohistoquímica. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários, com variação no tempo de incubação e temperatura (ambiente ou a 4°C):

- anti-PCNA (monoclonal, 1/1000; *Sigma-Aldrich*), para as secções de tecido renal e tireoidiano.
- anti-alfa actina (monoclonal, 1/1000; *Sigma-Aldrich*), somente para as secções de tecido renal;

Em seguida, os cortes foram submetidos a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (monoclonal, 1:200) (*Vector Laboratories*). A reação foi detectada com auxílio do sistema avidina-biotina peroxidase (*Vector Laboratories*), sendo que a adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Company*) juntamente com peróxido de hidrogênio foi responsável pelo o desenvolvimento de cor. Posteriormente, a contracoloração foi realizada utilizando o corante *metilgreen*.

Para a diluição dos anticorpos e o bloqueio de ligações inespecíficas, foi utilizada uma solução de PBS com albumina bovina (BSA - *Bovine Serum Albumin - Sigma Chemical Company*), na concentração de 5%.

As imunorreações para alfa actina foram avaliadas analisando-se a porcentagem do glomérulo ou córtex renal marcados, atribuindo-se escores de 0 a 4 (KLIEM et al., 1996). Já para as reações de PCNA foi feita a contagem de células positivas por glomérulo, por campo do córtex renal ou por folículo tireoidiano e feita a média por lâmina.

Quadro 2 - Escores atribuídos para as imunorreações de alfa actina no tecido renal.

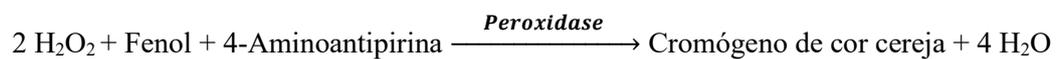
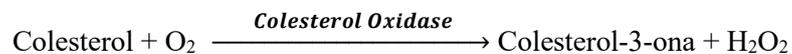
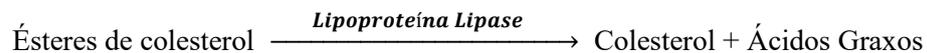
Escore 0: equivalente de 0 a 5% do campo marcado;
Escore 1: +5 e 25%;
Escore 2: +25 e 50%;
Escore 3: +50 e 75%;
Escore 4: +75 e 100%

4.7. Dosagem de hormônios tireoidianos

As dosagens dos níveis plasmáticos de T3 e T4 livres maternos e dos filhotes de 30 dias de idade foram realizadas pelo método de eletroquimioluminescência.

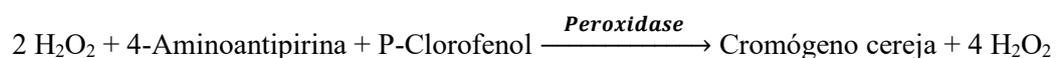
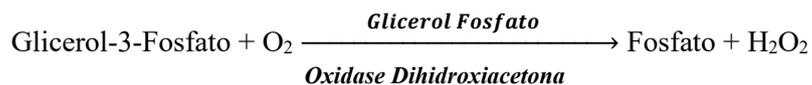
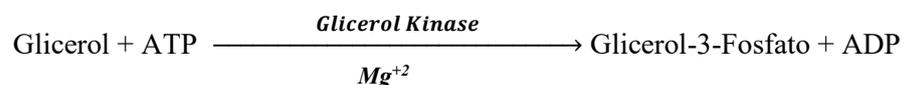
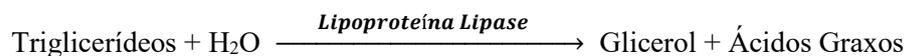
4.8. Dosagem de colesterol total e triglicerídeos

O colesterol total foi determinado por método enzimático-colorimétrico (Trinder). Neste experimento, ocorrem as seguintes reações:



Os reagentes do kit para dosagem de colesterol (Bioclin) são homogeneizados e colocados em banho-maria por 10 minutos à 37°C. Posteriormente, as absorbâncias das amostras e do padrão são lidas a 500nm com o auxílio de um espectrofotômetro. A intensidade da cor vermelha (cromógeno cereja) é diretamente proporcional à quantidade de colesterol da amostra.

Os triglicerídeos também foram determinados por método colorimétrico-enzimático (Trinder). Neste experimento, ocorrem as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha (cromógeno cereja) formada é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.

4.9. Estudos de função renal

Os estudos de função renal foram realizados nas mães, somente pela medida da creatinina plasmática, e nos animais de 30 dias de idade, através do clearance de creatinina. Os filhotes 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. Posteriormente, foi feita a dosagem de creatinina urinária e plasmática por método colorimétrico (Bioclin), onde as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas com o auxílio de um espectrofotômetro (510nm). Com as dosagens de creatinina plasmática, creatinina urinária e volume de urina em 24h foi possível a determinação da TFG.

A EUP foi determinada por método colorimétrico (Labtest) nos animais de 30 dias de idade. Neste experimento, o vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio. Estas substâncias formam um complexo, que ao combinar-se com proteínas presentes na amostra em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorbância obtida pela leitura das amostras (600nm) em espectrofotômetro é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

4.10. Análise estatística

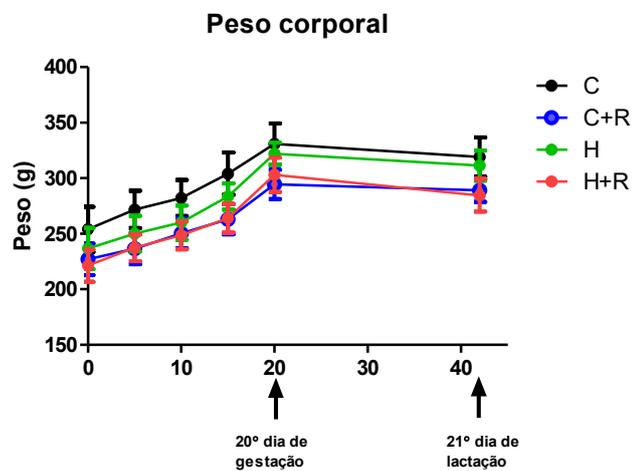
Para os parâmetros analisados utilizamos o programa *GraphPad Prism* (versão 7.00-Trial), empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Gaussiana). Os dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por teste paramétrico (ANOVA com pós-teste de Tukey ou Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni), e os dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados por teste não paramétrico (Kruskall-Wallis com pós-teste de Dunn). Os testes usados para cada parâmetro estudado foram citados na legenda de cada figura no item *Resultados*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Dados maternos

O peso corporal materno foi avaliado nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 de gestação e no 21º dia de lactação. Apesar das mães de todos os grupos terem apresentado ganho de peso durante a gestação, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, tanto durante a gestação, quanto no 21º dia de lactação (**figura 9**).

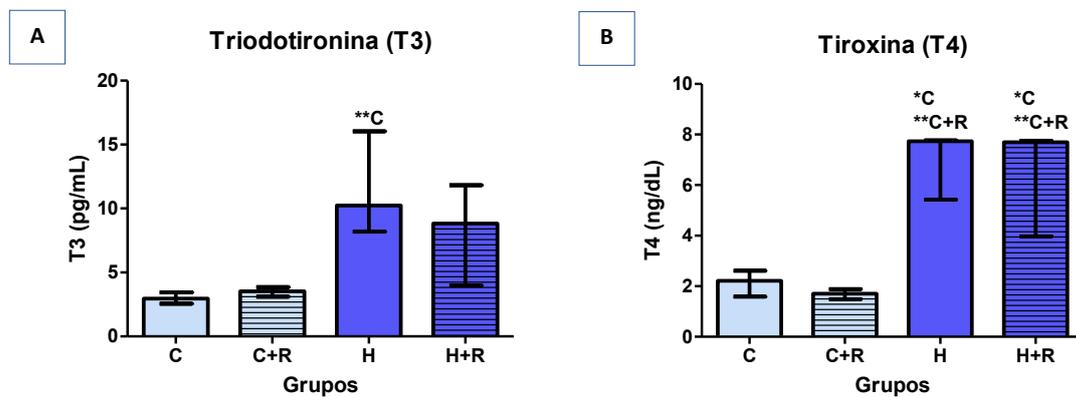
Figura 9 - Peso corporal materno.



Peso corporal materno dos grupos C (n=6), C+R (n=7), H (n=6) e H+R (n=8): Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

A administração de T4 durante a gestação resultou em alterações nas concentrações plasmáticas de T3 e de T4 nas mães do grupo H. Foi observado um aumento de T3 no grupo H, quando comparado ao grupo controle (**figura 10A**) e um aumento de T4 nos grupos H e H+R, quando comparados aos grupos C e C+R (**figura 10B**). O tratamento materno com RSV reverteu parcialmente apenas o aumento do hormônio T3 nos animais do grupo H+R (**figura 10A**).

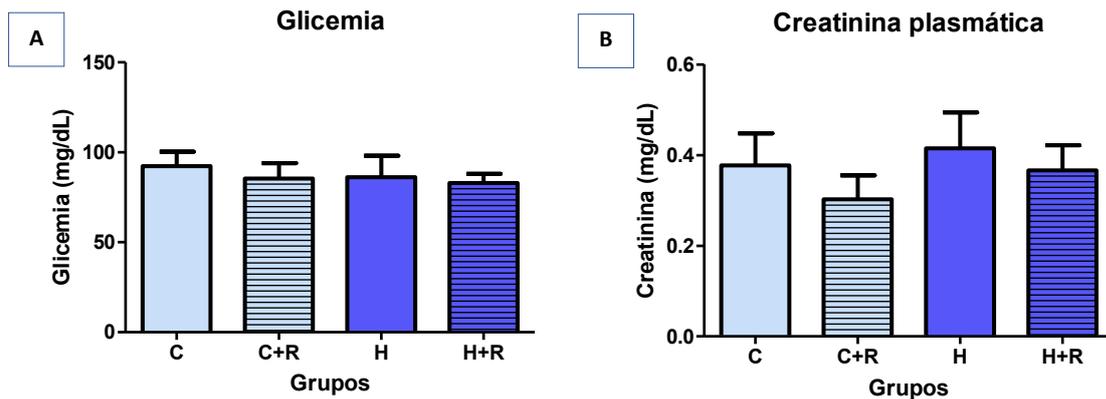
Figura 10 - Dosagens dos hormônios Triiodotironina - T3 (A) e Tiroxina - T4 (B) maternos.



Dosagens dos hormônios Triiodotironina - T3 (A) e Tiroxina - T4 (B) maternos dos grupos C (n=6), C+R (n=7), H (n=6) e H+R (n=8): Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C; **C+R: $p < 0,01$ versus C+R.

A glicemia e a concentração de creatinina plasmática foram avaliadas nas mães no 20º dia de gestação. Não houve diferença significativa nestes parâmetros entre os grupos estudados (figuras 11A e 11B).

Figura 11 - Glicemia (A) e Creatinina Plasmática (B) materna.



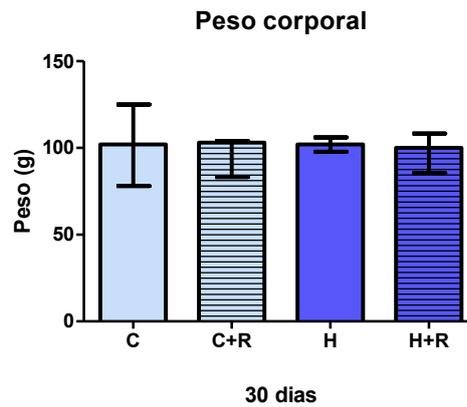
Glicemia (A) e Creatinina Plasmática (B) materna dos grupos C (n=6), C+R (n=7), H (n=6) e H+R (n=8): ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5.2. Dados da prole

5.2.1. Dados sobre o crescimento e desenvolvimento da prole

O peso corporal foi avaliado na prole de 30 dias de idade e não houve diferença significativa entre os grupos estudados (**figura 12**).

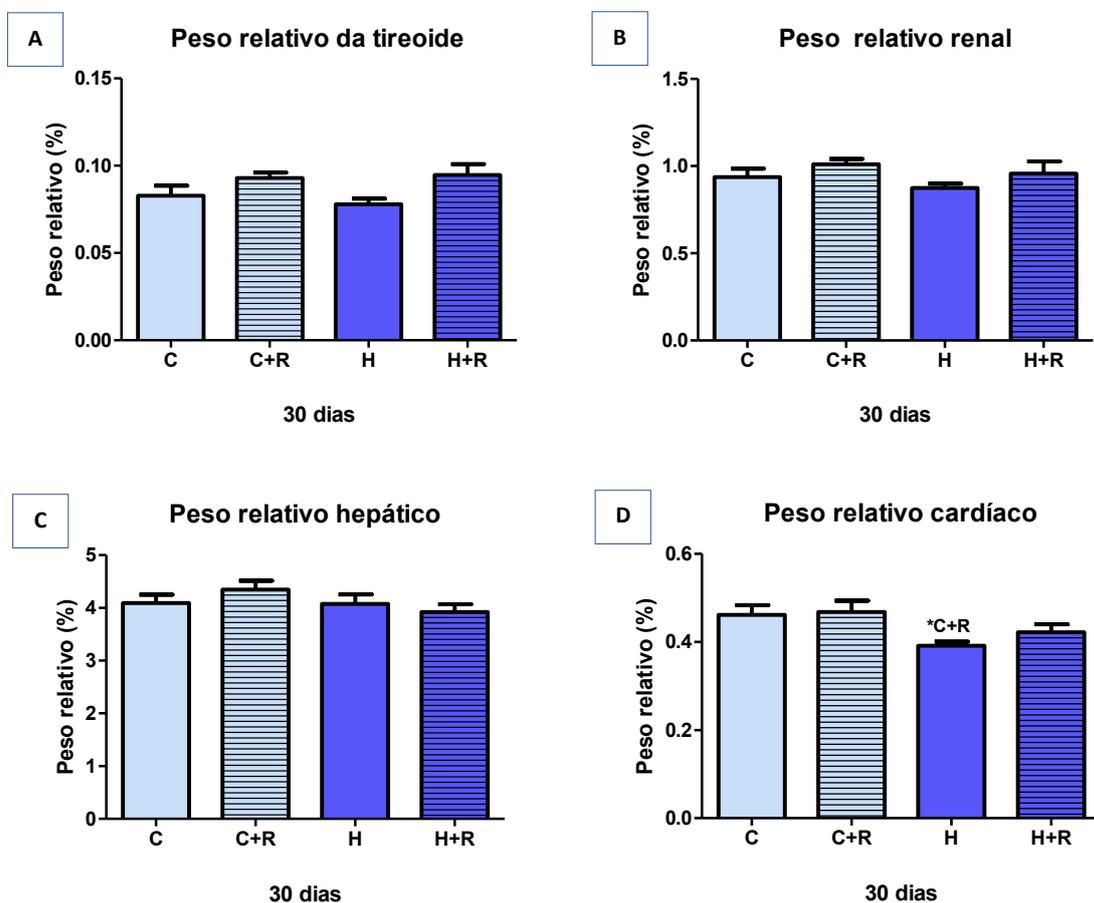
Figura 12 - Peso corporal da prole aos 30 dias de idade.



Peso corporal da prole aos 30 dias de idade dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6): Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Não se observou diferença significativa nos pesos relativos da tireoide (**figura 11A**), dos rins (**figura 13B**) e fígado (**figura 13C**) dos filhotes de 30 dias de idade, entre os grupos propostos. Porém, o peso relativo cardíaco (**figura 13D**) do grupo H foi menor, quando comparado ao grupo C+R. O tratamento com RSV não produziu efeitos nos animais controles, mas impediu parcialmente as alterações no peso relativo do coração em filhotes de mães com hipertireoidismo.

Figura 13 - Pesos relativos dos órgãos dos filhotes de 30 dias de idade: tireoide (A), rins (B), fígado (C) e coração (D).

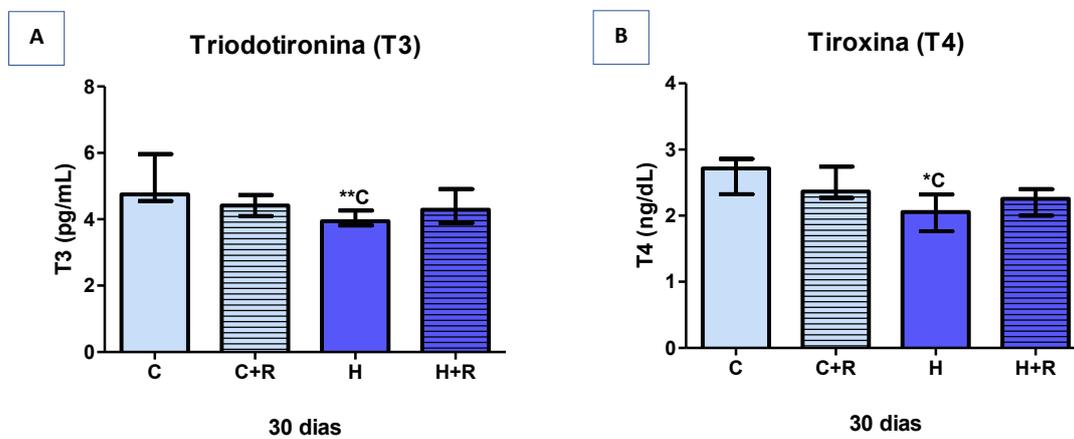


Pesos relativos dos filhotes de 30 dias de idade. Peso relativo da tireoide (A), rins (B), fígado (C) e coração (D) dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6): ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. *C+R: $p < 0,05$ versus C+R.

5.2.2. Dados hormonais e metabólicos

Os filhotes de 30 dias de idade de mães com hipertireoidismo (H) apresentaram uma diminuição nos níveis de hormônios T3 e T4, quando comparados ao grupo C (**figuras 14A e 14B**). O tratamento com RSV não produziu efeitos no grupo controle, mas impediu parcialmente as alterações nos níveis de T3 e T4 observadas em filhotes de mãe com hipertireoidismo.

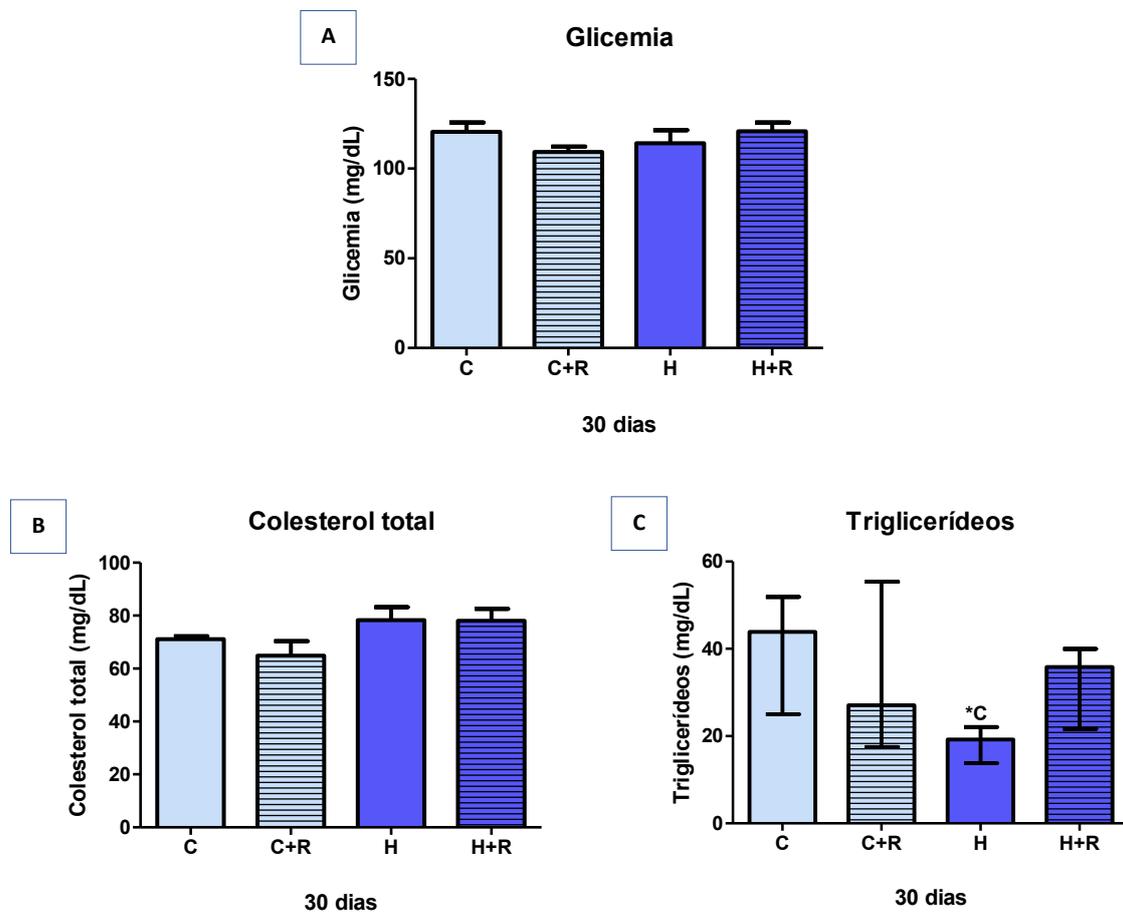
Figura 14 - Dosagens dos hormônios T3 (A) e T4 (B) nos filhotes de 30 dias de idade.



Dosagens dos hormônios T3 (A) e T4 (B) nos filhotes de 30 dias de idade dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6): Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C.

Em relação a glicemia e colesterol total, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (**figuras 15A e 15B**). Entretanto, o hipertireoidismo materno reduziu os níveis de triglicerídeos nos filhotes de 30 dias de idade, quando comparado ao grupo C (**figura 15C**). O tratamento com RSV não produziu efeitos no grupo C+R (**figuras 15A, 15B e 15C**) mas impediu parcialmente as alterações nos níveis de triglicerídeos no grupo H+R (**figura 15C**).

Figura 15. Glicemia (A), colesterol total (B) e triglicerídeos (C) dos filhotes de 30 dias de idade.

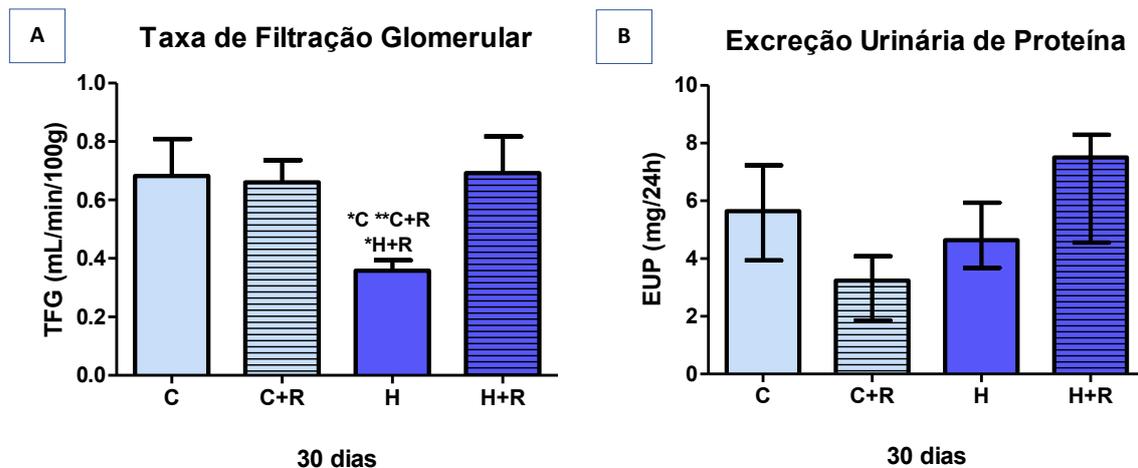


Glicemia (A), colesterol total (B) e triglicerídeos (C) dos filhotes de 30 dias de idade dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6). A e B: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. C: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. **C: $p < 0,01$ versus C; *C: $p < 0,05$ versus C.

5.2.3. Dados sobre função renal

Foi observada uma diminuição na TFG dos filhotes de mães com hipertireoidismo, quando comparado aos demais grupos estudados (**figura 16A**). O tratamento com RSV não produziu efeitos no grupo controle, mas impediu as alterações observadas na TFG. Com relação a EUP, não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados (**figura 16B**).

Figura 16 - Taxa de filtração glomerular (A) e excreção urinária de proteínas (B) dos filhotes de 30 dias.

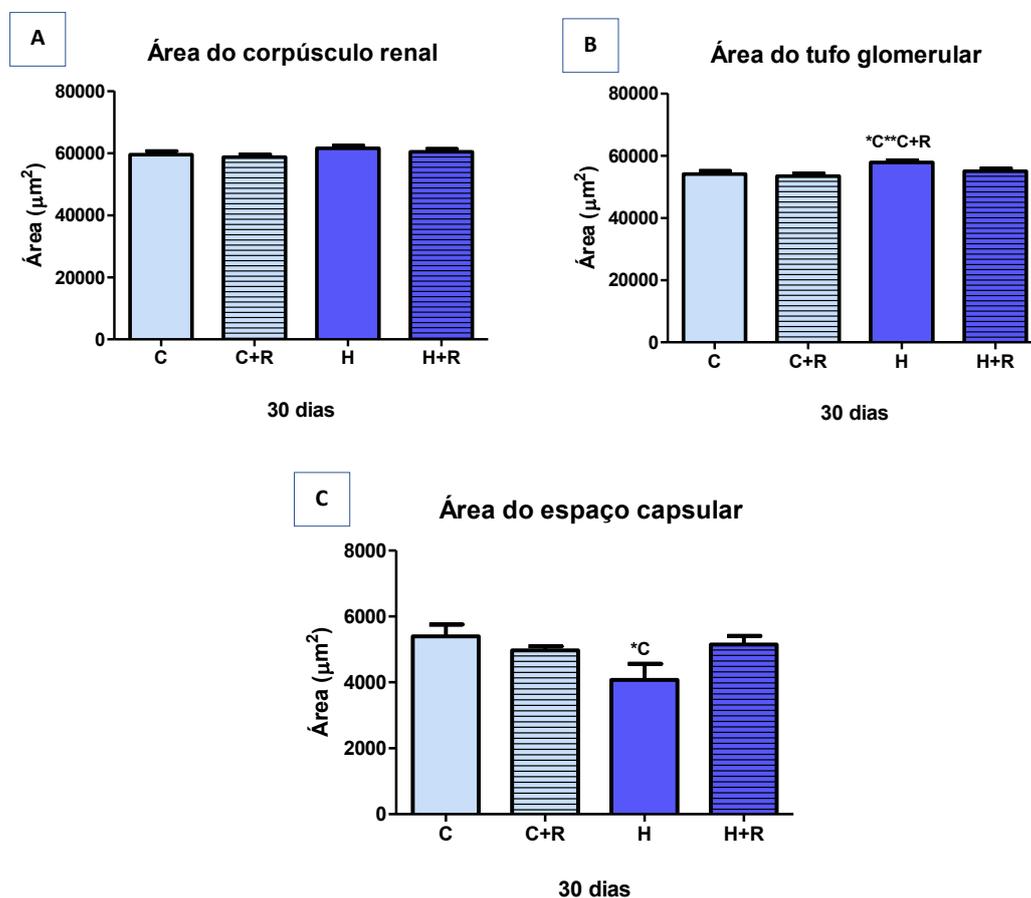


Taxa de filtração glomerular (A) e excreção urinária de proteínas (B) dos filhotes de 30 dias dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6). A: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B: Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. *C: $p < 0,05$ versus C; **C+R: $p < 0,01$ versus C+R; *H+R: $p < 0,05$ versus H+R.

5.2.4. Dados de morfometria e imunohistoquímica: renal e tireoidiana

Em relação a morfometria renal, os animais do grupo H apresentaram um aumento na área do tufo glomerular, quando comparado aos grupos C e C+R, e uma redução na área do espaço capsular, quando comparado ao grupo C (**figuras 17B e 17C**). O tratamento com RSV não provocou mudanças nos grupos C e C+R, mas reverteu parcialmente os efeitos do hipertireoidismo nesses parâmetros.

Figura 17 – Análise morfométrica renal: (A) área do corpúsculo renal, (B) área do tufo glomerular e (C) área do espaço capsular.

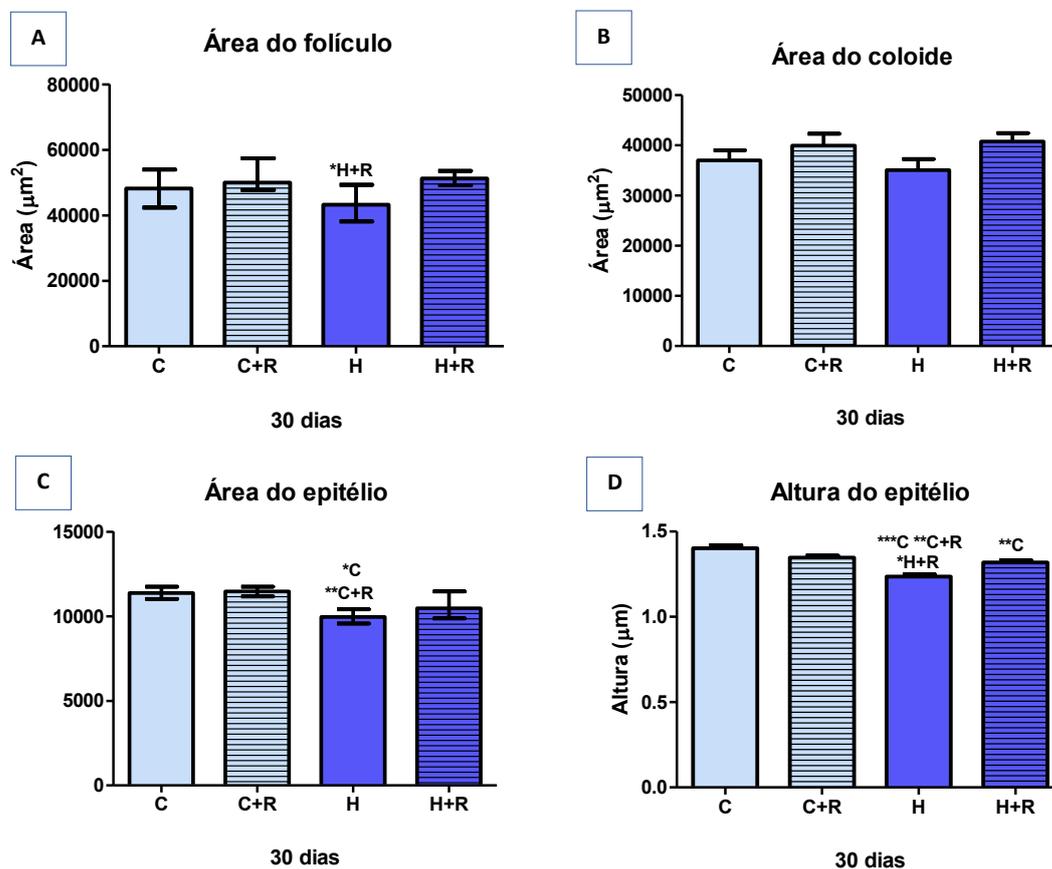


Análise morfométrica renal: (A) Áreas do corpúsculo renal, (B) do tufo glomerular e (C) espaço capsular dos filhotes de 30 dias dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6): ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

*C: $p < 0,05$ versus C; **C+R: $p < 0,01$ versus C+R.

Quanto à morfometria da tireoide, foi observado uma redução na área do folículo no grupo H, em relação ao grupo H+R (**figura 18A**). Além disso, o grupo H apresentou uma diminuição nas medidas de área do epitélio, quando comparado aos grupos C e C+R (**figura 18C**) e na altura do epitélio, em relação aos demais grupos (**figura 18D**). Não houve diferença significativa na área do coloide entre os grupos estudados (**figura 18B**). O tratamento com RSV não modificou o grupo controle, mas evitou as alterações promovidas pelo distúrbio materno (**figura 18D**).

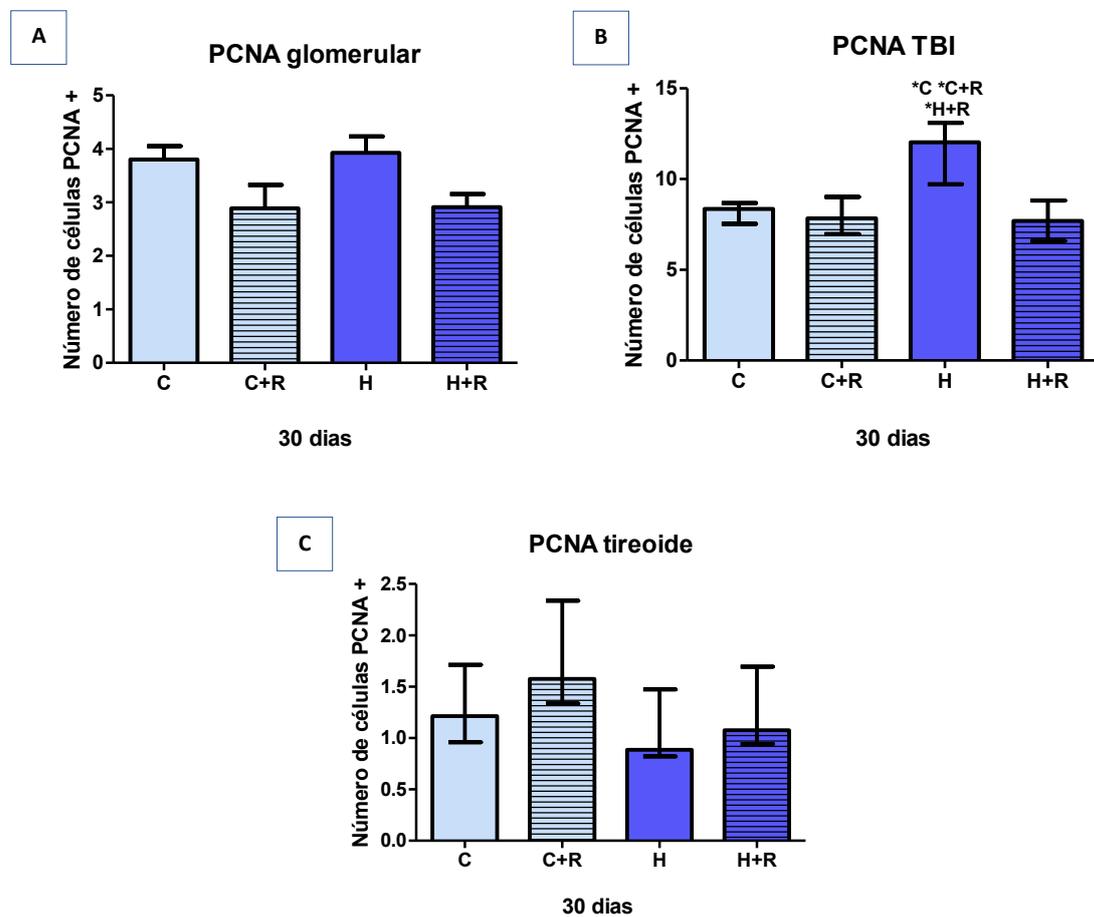
Figura 18 – Análise morfométrica da tireoide: (A) área do folículo, (B) área do coloide, (C) área do epitélio e (D) altura do epitélio.



Análise morfométrica da tireoide: (A) área do folículo, (B) área do coloide, (C) área do epitélio e (D) altura do epitélio dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6). A e C: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. B e D: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média ± EPM. 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; **C+R: $p < 0,01$ versus C+R; *H+R: $p < 0,05$ versus H+R.

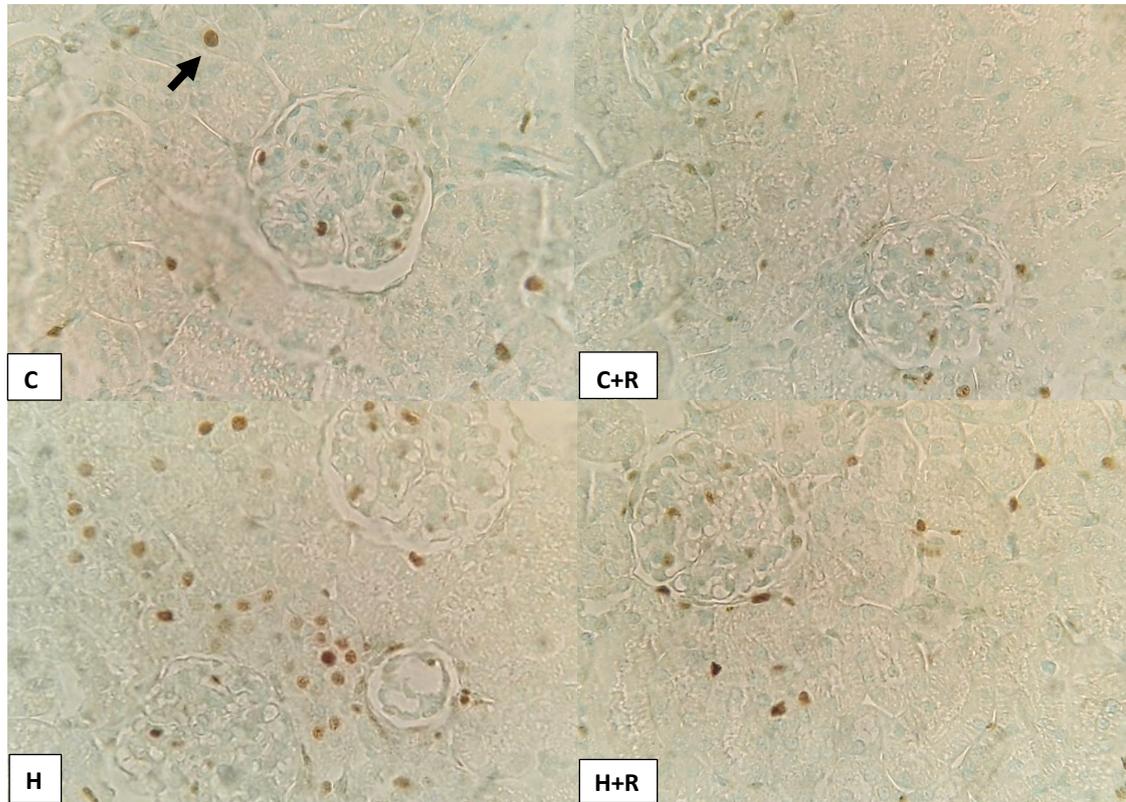
O hipertireoidismo materno aumentou o número de células PCNA positivas no compartimento TBI do córtex renal da prole com 30 dias de vida, quando comparado aos demais grupos estudados (**figura 19A**). O tratamento com RSV não produziu efeitos no grupo controle, mas impediu as alterações induzidas pelo hipertireoidismo materno (**figuras 19A, 19B e 19C**). Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados para o número de células PCNA positivas glomerulares (**figura 19A**) e tireoidianas (**figura 19C**).

Figura 19 – Imunohistoquímica para PCNA nos rins e na tireoide. (A) PCNA glomerular, (B) PCNA TBI e (C) PCNA na tireoide.



Imunohistoquímica para PCNA nos rins e na tireoide. PCNA glomerular (A), PCNA TBI (B) e PCNA na tireoide (C) dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6). A: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B e C: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. *C: $p < 0,05$ versus C; *C+R: $p < 0,05$ versus C+R; *H+R: $p < 0,05$ versus H+R.

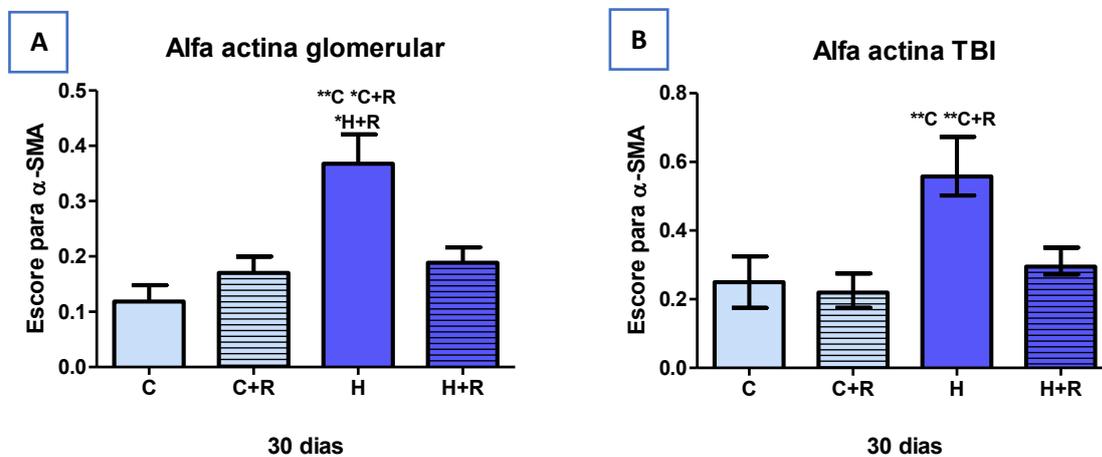
Figura 20 – Imunohistoquímica para PCNA renal nos grupos C, C+R, H e H+R.



Na figura, observa-se um aumento no número de células PCNA positivas no compartimento TBI do córtex renal dos animais de 30 dias do grupo H, enquanto o tratamento com resveratrol não provocou mudanças no grupo controle (C+R), mas impediu essa alteração no grupo H+R. Seta preta: célula PCNA positiva. Aumento: 400x. Fonte: A autora, 2021.

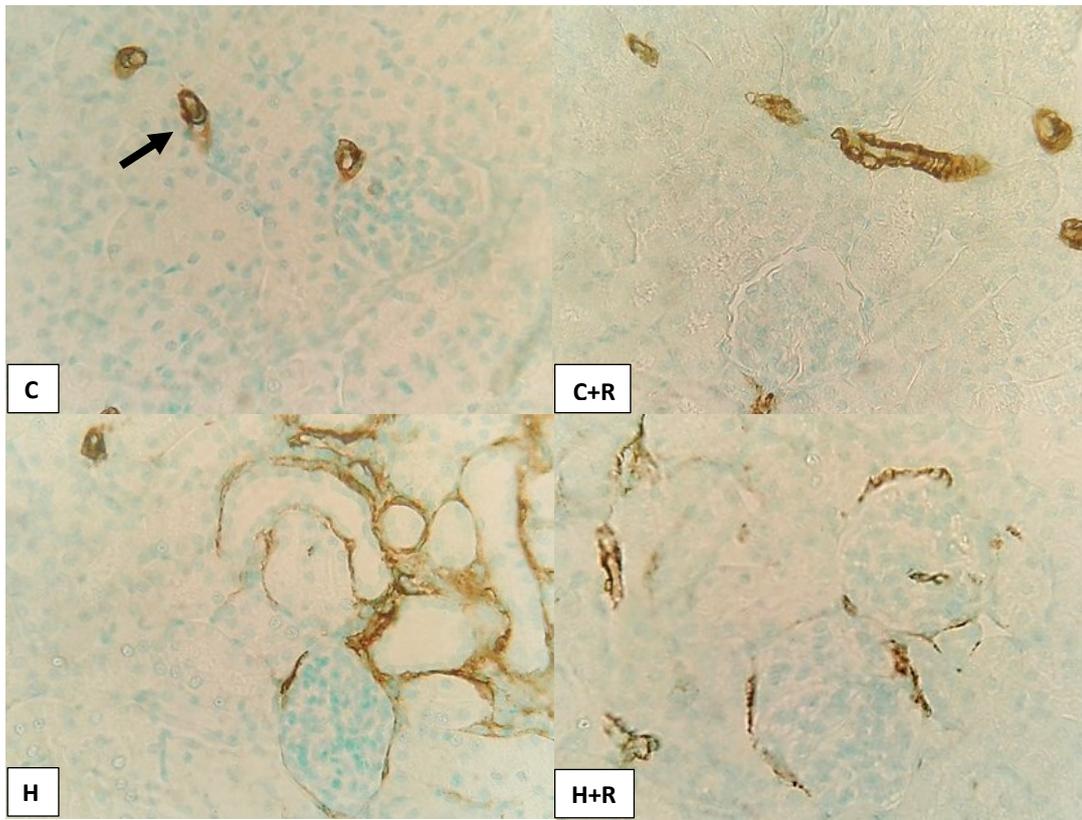
A imunohistoquímica para alfa actina foi realizada nos rins dos filhotes de 30 dias de idade e observou-se aumento na expressão deste marcador nos glomérulos dos filhotes de mães com hipertireoidismo, quando comparado aos demais grupos avaliados (**figura 21A**). Adicionalmente, também houve um aumento na expressão deste marcador no compartimento TBI, no córtex renal no grupo H, quando comparado aos grupos C e C+R (**figura 21B**). O tratamento com RSV não resultou em mudanças no grupo controle, mas evitou o aumento de alfa actina induzido pelo hipertireoidismo.

Figura 21 - Expressão de alfa actina glomerular (A) e no TBI (B) dos filhotes de 30 dias de idade.



Expressão de alfa actina glomerular (A) e no TBI (B) dos filhotes de 30 dias de idade dos grupos C (n=7), C+R (n=7), H (n=8) e H+R (n=6). A: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média \pm EPM. B: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os valores representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. **C: $p < 0,01$ versus C; **C+R: $p < 0,01$ versus C+R; *C+R: $p < 0,05$ versus C+R; *H+R: $p < 0,05$ versus H+R.

Figura 22 – Imunohistoquímica para alfa actina renal nos grupos C, C+R, H e H+R.



Na figura, observa-se que a expressão de alfa actina se restringe à musculatura lisa de vasos nos grupos C e C+R. No entanto, o hipertireoidismo materno provocou aumento da expressão de alfa actina no compartimento glomerular e TBI do córtex renal dos animais de 30 dias e o tratamento com resveratrol evitou essa alteração. Seta preta: expressão de alfa actina na musculatura lisa de vasos. Aumento: 400x. Fonte: A autora, 2021.

Quadro 3 - Resumo dos dados maternos

Parâmetros avaliados		Grupos Experimentais			
		C	C+R	H	H+R
Dados maternos	Peso Corporal	0	0	0	0
	T3	0	0	+ **C	0
	T4	0	0	+ *C, **C+R	+ *C, **C+R
	Glicemia	0	0	0	0
	Creatinina plasmática	0	0	0	0

C: Controle; C+R: Controle + Resveratrol; H: Hipertireoidismo; H+R: Hipertireoidismo + Resveratrol; 0: Sem diferença com relação aos controles; +: Aumento; -: Diminuição; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001. Fonte: A autora, 2021.

Quadro 4 - Resumo dos dados da prole

Parâmetros avaliados		Grupos Experimentais			
		C	C+R	H	H+R
Dados da prole	Peso Corporal	0	0	0	0
	PR da tireoide	0	0	0	0
	PR renal	0	0	0	0
	PR hepático	0	0	0	0
	PR cardíaco	0	0	- *C+R	0
	T3	0	0	- **C	0
	T4	0	0	- *C	0
	Glicemia	0	0	0	0
	Colesterol total	0	0	0	0
	Triglicerídeos	0	0	- *C	0
	TFG	0	0	- *C, **C+R, *H+R	0
	EUP	0	0	0	0
	Área do Corpúsculo Renal	0	0	0	0
	Área do Tufo Glomerular	0	0	+ *C, **C+R	0
	Área do Espaço Capsular	0	0	- *C	0
	Área do Folículo	0	0	- *H+R	0
	Área do Coloide	0	0	0	0
	Área do Epitélio	0	0	- *C, **C+R	0
	Altura do Epitélio	0	0	- ***C, *C+R, *H+R	+ **C
	PCNA Glomerular	0	0	0	0
	PCNA TBI	0	0	+ *C, *C+R, *H+R	0
	PCNA Tireoide	0	0	0	0
	Alfa actina Glomerular	0	0	+ **C, *C+R, *H+R	0
Alfa actina TBI	0	0	+ **C, **C+R	0	

C: Controle; C+R: Controle + Resveratrol; H: Hipertireoidismo; H+R: Hipertireoidismo + Resveratrol; PR: Peso relativo; 0: Sem diferença com relação aos controles; +: Aumento; -: Diminuição; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001. Fonte: A autora, 2021.

5. DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos possuem um papel crucial no processo de organogênese e qualquer desbalanço em sua produção e/ou secreção pode prejudicar o desenvolvimento fetal (MUNOZ et al, 2019). Nesse contexto, modelos experimentais de hipotireoidismo ou hipertireoidismo gestacionais têm contribuído consideravelmente para elucidação desse papel. VARAS e colaboradores, em 2001, administraram injeções cutâneas de T4 (na dose de 100µg/kg) em ratas *Wistar* durante a gravidez e a lactação e observaram um aumento nos níveis de T3 e T4 nas ratas tratadas, quando comparadas ao grupo controle, estabelecendo um modelo de hipertireoidismo gestacional. No presente trabalho, optou-se por tratar as mães do grupo H e H+R com T4, via gavagem, na dose de 250µg/kg, durante a gestação. Além disso, o grupo H+R foi tratado com RSV durante o mesmo período. Os níveis de T3 e T4 maternos estavam aumentados significativamente no grupo H, enquanto que o grupo H+R apresentou um aumento somente de T4. De qualquer forma, pode-se concluir que houve sucesso na indução de hipertireoidismo materno e que o RSV possa ter minimizado a alteração nos níveis de T3.

A glândula tireoide é responsável por produzir, em maiores concentrações, o hormônio T4, entretanto, o T3 é sua forma ativa. Em condições fisiológicas, cerca de 80% do hormônio T3 presente no plasma humano é originado da conversão de T4 em T3, através das enzimas desidases. Em ratos, esta proporção é de 40-50% (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016). As enzimas desidases possuem diferentes graus de expressão nos tecidos, por exemplo, a enzima D1 está presente na membrana plasmática de células do fígado, rins, tireoide e pituitária. Já a enzima D2, está localizada no retículo endoplasmático das células e seu principal local de ação é no cérebro, entretanto, ela também pode ser encontrada em menor quantidade em outros locais, como: tecido adiposo marrom, pituitária, placenta e em células do sistema imune inato. A enzima D3, por sua vez, está presente na membrana plasmática de neurônios, porém, sua atividade encontra-se aumentada durante a gestação, possuindo um papel importante na regulação dos níveis de T3 para o feto (ORTIGA-CARVALHO et al, 2016; VAN DER SPEEK et al, 2017). As enzimas D1 e D2 são responsáveis pela maior parte da conversão do hormônio T4 em sua forma ativa, enquanto a enzima D3 atua na inativação do T3, convertendo-o em T2 ou rT3 (VAN DER SPEEK et al, 2017; KORHLE, 2018).

O balanço entre a atividade das desidases D1, D2 e D3 é um dos principais fatores que determinam a quantidade de T3 circulante no organismo. Além disso, distúrbios endócrinos podem alterar a expressão de genes que codificam estas enzimas (genes: DIO1 para D1, DIO2 para D2 e DIO3 para D3) (MANCINI et al, 2016). Como exemplo disso, o hipertireoidismo é responsável por diminuir tanto a atividade da enzima D2, quanto a expressão do gene DIO2,

enquanto o hipotireoidismo exerce o oposto (KOENIG et al, 2005; SWEIZER et al, 2015; MANCINI et al, 2016).

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliam a correlação entre o tratamento com RSV e a função tireoidiana (DUNTAS et al, 2011; OURIQUE et al, 2013; GIULIANI et al, 2014; FUJITA et al, 2017; GIULIANI et al, 2017; RAUF et al, 2017). Entretanto, estudos recentes sugerem que o RSV pode interagir com as enzimas desidases, embora estes mecanismos ainda não tenham sido esclarecidos. CHESEREK e colaboradores, em 2016, administraram RSV (65mg/kg) por 26 semanas em camundongos tratados com dieta hiperlipídica. Nos animais que receberam somente a dieta obesogênica, foi observado um aumento significativo de TSH e T4, acompanhado de uma diminuição nos níveis de T3. Estes dados corroboram com uma diminuição na expressão de DIO1, indicando que a conversão de T4 em T3 pela enzima D1 estava prejudicada neste grupo experimental. Já os animais que receberam RSV e a dieta, apresentaram uma melhora no quadro, visto que os níveis de T3 foram normalizados. Além disso, estes resultados foram acompanhados de um aumento na expressão de DIO1. Entretanto, a correlação entre o RSV e a expressão de DIO2 e DIO3 ainda não foi investigada.

Em relação a este trabalho, a hipótese é de que o RSV administrado nas mães do grupo H+R pode ter aumentado tanto a atividade, quanto a expressão da enzima D3 nestes animais, possibilitando um aumento na conversão periférica de T4 em suas formas inativas (rT3 e T2), esta hipótese explicaria os menores níveis de T3 encontrados neste grupo experimental. No entanto, futuras investigações sobre interações entre RSV e desidases são necessárias neste modelo. Adicionalmente, é importante ressaltar que o grupo C+R não apresentou alterações nos níveis de T3 e T4, quando comparado aos demais grupos estudados, indicando que o RSV não interferiu nesse grupo.

O hipertireoidismo é caracterizado por desenvolver um estado hipermetabólico nos pacientes, causando um aumento do gasto energético e, conseqüentemente, perda de peso corporal (RIZOS et al, 2011; DIZAYE E MUSTAFA et al, 2019). Este quadro também é observado em modelos animais deste distúrbio endócrino (DIZAYE E MUSTAFA, 2019; VENEDIKTOVA, 2020). RIJNTJES e colaboradores, em 2008, utilizaram uma dieta suplementada com T4 (150µg/kg) em ratas *Wistar* durante 12 semanas antes da gestação, continuando com o respectivo tratamento até o desmame dos filhotes, ao 28º dia pós nascimento. Não foi observada diferença significativa nos dados de peso corporal materno durante a gestação e a lactação, no tamanho da ninhada e no peso corporal dos filhotes no primeiro dia de vida. Os dados de peso corporal materno de Rijntjes e colaboradores

corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, visto que não houve diferença significativa neste parâmetro entre os grupos estudados, apesar do tamanho da ninhada não ter sido avaliado. No entanto, uma diferença importante entre os dois trabalhos é o tempo em que as mães foram expostas ao hipertireoidismo.

O hipertireoidismo pode alterar o metabolismo de glicose através de diversos mecanismos, como por exemplo, o aumento da gliconeogênese hepática e a diminuição da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas e estas alterações estão relacionadas com ações específicas do T3 nestes tecidos (CRUCKHORN e PATTI, 2008). Neste trabalho, foi avaliada a glicemia nas ratas grávidas ao 20º dia de gestação. Entretanto, nenhuma alteração foi observada neste parâmetro. FUKUCHI e colaboradores, em 2002, utilizaram um modelo de hipertireoidismo em ratos da linhagem *Sprague-Dawley*, com injeções intraperitoniais de T4 em menor (100 μ g/kg) e maior dose (600 μ g/kg), em um período de 2 semanas. Após realizarem uma sobrecarga de glicose por via oral nos animais, apenas o grupo que recebeu a maior dose de T4 apresentou alteração glicêmica. No entanto, a dose de T4 utilizada neste estudo, pode não ter sido suficiente para causar este tipo de alteração.

Os hormônios tireoidianos exercem um papel importante na função renal, participando do crescimento e desenvolvimento do órgão, garantindo a homeostase de eletrólitos, a manutenção da TFG e a capacidade absorptiva e secretória dos túbulos renais (DEHOLLANDER et al, 2005; BASU e MOHAPRATA, 2012; SOMNEZ et al, 2019). A literatura traz evidências de que o hipertireoidismo pode prejudicar os rins através do aumento da TFG e do fluxo plasmático renal (FPR), e o principal mecanismo envolvido nestas alterações é o SRA, que geralmente encontra-se hiperativado nestas condições (SOMNEZ et al, 2019; ALBRAHIM et al, 2020). No presente trabalho, a avaliação da função renal materna foi realizada através da dosagem de creatinina plasmática no 20º dia de gestação e o hipertireoidismo não interferiu nesse parâmetro. Existem poucos trabalhos na literatura que avaliam a função renal em modelos animais de hipertireoidismo gestacional, a maioria avalia esse parâmetro somente em ratos ou camundongos adultos, ou seja, fora do período gravídico. DIZAYE e MUSTAFA, em 2019, trataram ratos *Wistar* machos com T4 (0,0012%) na água de beber durante 30 dias consecutivos e foi observado um aumento nos níveis séricos de creatinina destes animais, quando comparados ao grupo controle. A divergência nos resultados encontrados neste trabalho em comparação com os dados de DIZAYE e MUSTAFA pode ser explicada por três fatores: primeiro, o tempo de tratamento com o hormônio T4, que pode interferir na magnitude das alterações causadas por este distúrbio endócrino; segundo, o sexo do animal utilizado no modelo experimental; e terceiro, a dose e o método de administração de T4.

Em ratos, o eixo HPT e a glândula tireoide atingem a maturidade somente no 21º pós-natal, que coincide com o período de desmame destes animais. Antes do nascimento, o feto sofre grande influência das concentrações de T3 e T4 plasmáticas da mãe, visto que estes hormônios atravessam a barreira placentária. Depois do nascimento, a prole continua a receber determinadas quantidades destes hormônios através do leite materno (WALLING et al, 2016). A literatura mostra que filhotes de mães com hipertireoidismo tratadas com T4 durante a gravidez e a lactação possuem um aumento tanto de T3, quanto de T4 nos primeiros dias de vida, como foi visto no trabalho de VARAS (2001) e AHMED (2012). Entretanto, no estudo de VARAS, não houve diferença significativa nos níveis destes hormônios nos filhotes de mães hipertireoideas, a partir do 21º dia de vida, enquanto que no de AHMED, os filhotes de mães hipertireoideas com 21 dias de vida ainda apresentavam altos níveis de T3 e T4. Estes dados mostram que, após a maturação completa da glândula e a interrupção do fornecimento materno de hormônios via lactação, a prole possui comportamentos diferentes em relação à produção e secreção de T3 e T4. É importante ressaltar que as doses de T4 administradas nestes trabalhos foram diferentes, apesar do tempo de tratamento ter sido o mesmo. VARAS e colaboradores administraram doses de T4 via injeções subcutâneas, na dose de 100µg/kg, enquanto AHMED e colaboradores, administraram doses de T4 via gavagem que se iniciaram na concentração de 50µg/kg nos primeiros dias de tratamento, até atingirem gradativamente a dose de 200µg/kg, além de terem oferecido aos animais, desde o início da gestação, a dose de 0,002% de T4 na água de beber, *ad libitum*. Diferente dos trabalhos de VARAS (2001) e AHMED (2012), este estudo interrompeu o tratamento materno com T4, após o parto, e dosagens hormonais maternas não foram feitas durante a lactação. No entanto, foram avaliados os níveis de T3 e T4 da prole no 30º dia de vida. Os filhotes de mães hipertireoideas apresentaram uma diminuição nos níveis destes hormônios, quando comparados ao grupo controle. Possivelmente, a exposição intrauterina a altos níveis de hormônios tireoidianos prejudicou o desenvolvimento da glândula nos filhotes do grupo H. Esta hipótese é reforçada pelos resultados de morfometria da tireoide, que demonstraram diversas alterações que serão discutidas no decorrer deste estudo, como: diminuição nas medidas de área e altura do epitélio folicular, bem como uma diminuição na área do folículo.

Estudos demonstram que modelos animais de hipertireoidismo gestacional podem impactar na razão entre o peso de órgãos e o peso corporal da prole (KOBORI et al, 1998; VARGAS et al, 2006; RIJNTJES et al, 2008; BASU e MOHAPRATA 2012; LINO et al, 2012). Neste trabalho, não houve diferença entre o peso corporal dos filhotes de 30 dias de idade, nem nos pesos relativos da tireoide, rins e fígado. Entretanto, foi observada uma diminuição no peso

relativo cardíaco na prole do grupo H, quando comparado ao grupo C+R, indicando que sua organogênese foi prejudicada pelo distúrbio endócrino materno. Por outro lado, o tratamento com RSV reverteu este quadro, uma vez que os filhotes do grupo H+R apresentaram comportamento semelhante aos grupos C e C+R. Embora existam poucos estudos que avaliem os efeitos do tratamento com RSV no hipertireoidismo gestacional, existem alguns trabalhos que evidenciam efeitos cardioprotetores deste composto em outros distúrbios maternos, como hipertensão e síndrome metabólica (CARE et al, 2016; HOU et al, 2019). Dentre seus benefícios, destacam-se ações antioxidantes e anti-inflamatórias (ZHENG et al, 2018; HOU et al, 2019).

Para avaliação dos dados metabólicos da prole, é importante destacar que um dos efeitos programados pelo hipertireoidismo materno, principalmente nos filhotes de 30 dias do grupo H, foi o desenvolvimento de um quadro de hipotireoidismo, sendo menos severo nos filhotes do grupo H+R. Os hormônios tireoidianos são responsáveis por regular tanto os níveis de colesterol e triglicerídeos, quanto a secreção de insulina. Portanto, alterações nos níveis de T3 e T4 podem causar um desbalanço nos perfis lipídico e glicêmico do indivíduo (RIZOS et al, 2011). Apesar destas evidências, não foram observadas alterações de glicemia e colesterol total na prole. Possivelmente estas alterações poderiam ser evidenciadas mais tardiamente, visto que animais de 30 dias ainda são considerados jovens. Entretanto, uma diminuição nos níveis de triglicerídeos foi observada no grupo H.

Pacientes com hipotireoidismo geralmente apresentam altos valores de triglicerídeos, porém, baixos valores neste parâmetro já foram relatados (NIKKILA e KEKKI, 1972; RIZOS et al, 2011). BOLKINI e colaboradores, em 2019, realizaram um estudo utilizando camundongos *Swiss* com hipotireoidismo e hipertireoidismo, com o objetivo de avaliar os perfis metabólico e lipídico destes quadros. Além disso, eles avaliaram os possíveis benefícios do tratamento com o composto natural *Saussurea lappa* nestes grupos, conhecido por suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias. O modelo de hipotireoidismo utilizado se deu através da administração de uma droga que inibe a produção de hormônios tireoidianos, denominada propiltiouracil (PTU), a 0,05%, na água de beber dos animais. O modelo de hipertireoidismo foi realizado com administração de T4, na dose de 100µg/kg, também na água de beber. Ambos os tratamentos duraram 4 semanas. Os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos estavam aumentados no grupo hipotireoideo, enquanto que no grupo hipertireoideo, estes parâmetros diminuíram. O tratamento com o composto antioxidante normalizou o perfil lipídico de ambos os grupos, gerando resultados semelhantes aos do grupo controle. Comparando-os com os dados deste trabalho, observa-se uma divergência entre os resultados, pois apesar dos animais

do grupo H apresentarem um quadro de hipotireoidismo aos 30 dias de vida, seu metabolismo de triglicerídeos encontrou-se elevado, causando uma diminuição nos seus níveis séricos. No entanto, esta divergência de dados pode ser explicada pelo fato da prole ter sido exposta a um ambiente intrauterino hipertireoideo, que pode ter alterado o metabolismo lipídico dos filhotes.

Curiosamente, quando se observa o estudo de BOLKINI e colaboradores (2019) em relação ao tratamento de animais portadores de distúrbios tireoidianos com um composto antioxidante e anti-inflamatório, houve uma reversão nas alterações de perfil lipídico destes animais. Neste trabalho, observou-se uma reversão parcial no grupo H+R, de mães hipertireoideas tratadas com RSV. Estes dados reforçam a hipótese de que o RSV possa atuar na programação fetal, interferindo também no metabolismo de colesterol e triglicerídeos da prole.

Os distúrbios da tireoide podem causar severos impactos na função renal do portador. Geralmente, o hipertireoidismo é caracterizado por elevar a TFG, o FPR e a EUP, enquanto o hipotireoidismo possui ações opostas (LAGNSTON et al, 2006; BASU e MOHAPRATA, 2012). O principal mecanismo envolvido nestas alterações é a atividade do SRA, que encontra-se alterada em ambos os quadros (VARGAS et al, 2006). O presente trabalho observou uma diminuição na TFG dos animais do grupo H, quando comparada aos demais grupos estudados, enquanto a EUP não sofreu alterações. O resultado de baixa TFG se assemelha a diversos modelos animais de hipotireoidismo (TAYLOR et al, 1964; MICHAEL et al, 1972; EMMANUEL et al, 1974) e ensaios clínicos humanos desta doença (MONTENEGRO et al, 1996; DIEKMAN et al, 2001; SUHER et al, 2005), embora existam poucos estudos na literatura que avaliem a função renal de filhotes de mães com distúrbios da tireoide. Vale destacar ainda, que o tratamento materno com RSV impediu a perda de função renal da prole de mães hipertireoideas. Apesar de existirem poucos estudos que avaliem os mecanismos protetores renais do RSV em modelos de disfunção da tireoide, o RSV mostrou-se benéfico nos rins de animais expostos a modelos experimentais de diabetes mellitus (KITADA et al, 2013). SHARMA e colaboradores, em 2006, reportaram que o tratamento com RSV, nas doses de 5 e 10mg/kg, melhorou a EUP e o estresse oxidativo renal em ratos diabéticos. Adicionalmente, PALSAMY e SUBRAMARIAN (2011) observaram a normalização da TFG e da inflamação renal em ratos diabéticos tratados com RSV, na dose de 5mg/kg.

CANAVAN e colaboradores, em 1994, avaliaram o crescimento dos rins, fígado e diafragma de neonatos com disfunções da tireoide em relação ao *turnover* de proteínas. Os órgãos foram coletados na prole no 12º dia de vida. Para o modelo de hipotireoidismo, os autores utilizaram a droga PTU, na dose de 200mg/L, na água de beber de ratas *Wistar* durante

o 12º dia de gravidez até lactação e, para o modelo de hipertireoidismo, foi administrado o hormônio T4 nos neonatos, na dose de 10µg/kg, do 3º até 12º dia de vida. Foi constatado um retardo no crescimento da prole de mães hipotireoideas em 12%, além de um déficit no desenvolvimento dos três órgãos avaliados. Quanto aos neonatos hipertireoideos, não foram observadas diferenças no crescimento do fígado e do diafragma, porém, os rins apresentaram um leve grau de hipertrofia. Contudo, estes resultados mostram que os órgãos podem responder de maneiras diferentes em relação ao crescimento e desenvolvimento quando estão expostos a modelos de disfunções da tireoide. É importante salientar, que neste trabalho o peso relativo renal não foi diferente entre filhotes de mães hipertireoideas e controles. No entanto, o hipertireoidismo materno, além de reduzir a TFG na prole de 30 dias, provocou alterações morfométricas renais importantes como aumento do tufo glomerular e redução do espaço capsular, além do tratamento com RSV ter revertido parcialmente essas alterações. ALBRAHIM e colaboradores, em 2020, analisaram os efeitos protetores renais de um extrato de semente de uva (*Vitis vinifera*), rico em flavonoides e polifenóis, incluindo pequenas doses de RSV (ZHENG et al, 2018), em camundongos *Swiss* com hipertireoidismo. O modelo de hipertireoidismo se deu através da administração de T4 (100µg/kg), por três semanas, e o tratamento com o extrato (50mg/kg) ocorreu nas três semanas seguintes, após o quadro hipertireoideo ser estabelecido. Os animais com hipertireoidismo demonstraram uma diminuição na área glomerular, um aumento no espaço capsular e infiltração de células inflamatórias no compartimento TBI. Já os animais hipertireoideos, posteriormente tratados com o extrato de semente de uva, apresentaram todos estes parâmetros normalizados, ou seja, semelhantes ao grupo controle. Ao comparar os resultados deste trabalho com àqueles apresentados por ALBRAHIM, é importante ressaltar que o referido grupo de estudo avaliou os impactos renais do hipertireoidismo para os animais portadores adultos, não se tratando, portanto, de um estudo de programação fetal. Além disso, o extrato da semente de uva contém doses baixas de RSV, juntamente com inúmeros outros compostos químicos, que podem ter também auxiliado nos benefícios retratados pelo estudo. Contudo, é curioso observar que o tratamento com RSV ou com o extrato de *V. vinifera* é capaz de melhorar os quadros de injúria renal causados por disfunções da tireoide em diferentes magnitudes e contextos, visto que neste trabalho, os animais de 30 dias de idade de mães hipertireoideas apresentaram baixos níveis de T3 e T4, enquanto os de ALBRAHIM, apresentaram-se hipertireoideos.

Complementando as avaliações renais, foram realizadas reações de imunohistoquímica para os marcadores PCNA e alfa actina nos rins dos filhotes de 30 dias de idade. O *Proliferation Cell Nuclear Antigen* (PCNA) é uma proteína nuclear de 36 kD, em que

a expressão está relacionada com a fase S do ciclo celular (CELIS e CELIS, 1985; HALL et al., 1990). Sendo assim, em estudos imunohistoquímicos, células PCNA positivas indicam células em proliferação (HALL et al., 1990; MARQUEZ et al., 2002). Já a alfa actina, em condições normais, é uma proteína com função de contratilidade e encontra-se expressa em vasos sanguíneos, porém, sob condições patológicas, algumas células renais podem apresentar alterações no seu fenótipo e passarem a expressar alfa actina como células mesangiais e miofibroblastos intersticiais (NOVAKOVIC et al, 2012; ZHOU et al, 2020). Estas células começam a expressar alfa actina e aumentam a produção de colágeno e outros componentes da matriz extracelular, e estes fatores podem resultar em fibrose tecidual (EDDY, 1996; HOWIE et al., 1995; ZHANG; MOORHEAD; EL NAHAS, 1995). Durante o desenvolvimento renal, tanto a expressão de PCNA, quanto de actina encontram-se aumentadas, uma vez que o órgão ainda está em formação, entretanto, suas marcações tendem a diminuir, conforme ocorre a maturação renal (SAIFUDEEN et al, 2002). Em ratos, a nefrogênese se inicia por volta do 12º dia de gestação, e se completa entre 10 a 15 dias após o nascimento (NIGAM et al, 1996). Contudo, o aumento da expressão de PCNA e alfa actina em rins maduros pode indicar lesão tecidual. Neste trabalho, o hipertireoidismo gestacional aumentou o número de células PCNA positivas apenas no compartimento TBI e foi responsável também pelo aumento da expressão de alfa actina nos compartimentos glomerular e TBI do córtex renal da prole de 30 dias, em relação aos demais grupos. Aliás, o aumento de alfa actina glomerular pode explicar o aumento do tufo glomerular no córtex renal da prole de mães hipertireoideas, devido ao aumento de matriz extracelular, e consequente redução do espaço capsular, já que a área do corpúsculo renal não sofreu modificações, dados que provavelmente contribuíram para a redução da função renal apresentada pela prole do grupo H. Além disso, o tratamento materno com RSV impediu as mudanças na expressão de alfa actina e presença de células PCNA positivas induzidas pelo hipertireoidismo. Estes resultados, em complementação com a baixa TFG apresentada pelo grupo H, demonstram que os rins destes filhotes sofreram consequências em nível funcional e de arquitetura tecidual, após a exposição a um ambiente intrauterino com altos níveis de T3 e T4.

BOHLE e colaboradores, em 1987, avaliaram biópsias renais de pacientes que apresentavam quadros de injúria tecidual. Os autores concluíram que lesões tubulointersticiais, como fibrose e atrofia tubular, podem levar a uma redução da TFG, visto que a passagem de fluxo sanguíneo nos vasos pós-glomerulares encontra-se comprometida. Além disso, BOHLE observou que os glomérulos podem se adaptar à estas alterações tubulares, causando ou não mudanças estruturais a nível glomerular. Comparando com os resultados deste trabalho, os

filhotes de mães hipertireoideas apresentaram lesão no compartimento TBI no córtex renal, evidenciada com o aumento de alfa actina neste local. Contudo, estas alterações podem ter influenciado na diminuição da TFG apresentada por este grupo experimental, entretanto, são necessários outros experimentos para investigar a causa do aumento da área do tufo glomerular observada nestes filhotes.

Em mamíferos, o tufo glomerular é composto por três células principais: as células endoteliais, os podócitos e as células mesangiais (ZIMMERMAN et al, 2018). Em quadros de injúria glomerular, podem ocorrer lesões em qualquer uma, ou em mais de uma destas populações celulares. Além disso, estas alterações podem ocorrer em diferentes magnitudes, dependendo do grau e da origem do problema (FOGO, 2015). No caso de lesões que atingem o mesângio, estas células podem sofrer proliferação, migração e/ou excesso na produção de matriz extracelular, e estes fatores possuem correlação positiva com uma diminuição na TFG (BOHLE et al, 1987; ABBOUD 2012). Além disso, um aumento na produção de ROS também pode causar alterações importantes neste local, como: hipertrofia, acúmulo de matriz extracelular e aumento na expressão de fatores de crescimento. Entretanto, ainda não foram desenvolvidos marcadores específicos para lesões mesangiais (ABBOUD, 2012; ZIMMERMAN et al, 2018). Estas evidências mostram outra hipótese sobre o aumento da área do tufo glomerular e a diminuição da TFG observadas nos filhotes de mães hipertireoideas, visto que um quadro de hipertrofia mesangial poderia ocasionar alterações semelhantes a estas na prole. Entretanto, mais experimentos são necessários para confirmar o tipo específico de lesão renal que estes filhotes apresentaram.

Além das avaliações metabólicas e renais, a tireoide da prole de 30 dias também foi analisada. O hipertireoidismo materno não alterou o número de células PCNA positivas nos folículos tireoidianos, entretanto, alterações morfométricas foram evidenciadas. Os animais do grupo H apresentaram uma diminuição na área do folículo, quando comparado ao grupo H+R. Além disso, houve uma diminuição na área do epitélio folicular, quando comparado aos grupos C e C+R, e a altura deste epitélio mostrou-se menor em relação aos demais grupos experimentais. AHMED e colaboradores, em 2010, avaliaram o desenvolvimento da tireoide de filhotes de ratas *Wistar* com disfunções tireoidianas durante a gravidez e a lactação. Para o modelo de hipotireoidismo gestacional, as fêmeas foram tratadas com Metimazol, outra droga que inibe a produção de hormônios tireoidianos, na água de beber, na concentração de 0,02%. Já para o modelo de hipertireoidismo, as mães foram tratadas com doses de T4 via oral que se iniciavam com 50µg/kg e eram aumentadas gradativamente até atingirem 200µg/kg. Além disso, as fêmeas hipertireoideas receberam T4 também pela água de beber, na concentração de

0,002%. A glândula tireoide da prole de mães hipotireoideas apresentou diversas alterações, como: desintegração do lúmen folicular, hiperplasia, proliferação de fibroblastos e diminuição na área do colóide. Estas alterações foram acompanhadas de uma diminuição nos níveis de T3 e T4 da prole, demonstrando que estes filhotes estavam com um quadro hipotireoideo. Quanto a glândula tireoide da prole de mães hipertireoideas, as alterações observadas foram: atrofia da glândula, diminuição na área folicular e na altura do epitélio e deformação de alguns folículos. Estes resultados foram acompanhados de um aumento nos níveis de T3 e T4 da prole. Portanto, os resultados dos filhotes de 30 dias de idade do grupo H deste estudo, corroboram com os achados de AHMED (2010), em relação a diminuição da área folicular e altura do epitélio, embora esses animais (grupo H) tenham apresentado redução dos níveis de T3 e T4. Baseado nestas informações, as alterações encontradas neste trabalho em relação à estrutura da tireoide mostram que a exposição da prole ao hipertireoidismo materno prejudicou o desenvolvimento, o crescimento e a função da glândula nestes animais. O tratamento com RSV impediu parcialmente estas alterações, visto que a altura do epitélio folicular do grupo H+R mostrou-se menor, em comparação ao grupo controle. Entretanto, sabe-se que o tamanho e número das células foliculares podem ser alterados conforme a produção de hormônios T3 e T4 e/ou pela influência de TSH. No presente trabalho, há indícios de que os prováveis níveis elevados de TSH da prole, devido aos níveis reduzidos de T3 e T4 no grupo H, não sejam suficientes para promover aumento da proliferação celular na tireoide ou mesmo uma hipertrofia do epitélio, uma vez que não houve alteração no número de células tireoidianas PCNA positivas e nem no peso relativo da tireoide, além da área e altura do epitélio foliculares estarem reduzidos. Sendo assim, estudos devem ser conduzidos no sentido de se avaliar também o desenvolvimento da pituitária e do hipotálamo em filhotes de mães hipertireoideas.

Por fim, futuras investigações são necessárias para analisar os mecanismos pelos quais o hipertireoidismo materno é capaz de programar efeitos renais importantes na prole e também como o RSV pode atenuar esses efeitos, uma vez que o tratamento das mães do grupo controle com RSV não repercutiu em nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo.

6.1 CONCLUSÃO

O hipertireoidismo materno interferiu no metabolismo de triglicerídeos e programou alterações estruturais renais e tireoidianas importantes, que resultaram em perda de função renal e hipotireoidismo, respectivamente, na prole jovem de ratas *Wistar*. No entanto, o tratamento de mães hipertireoideas com RSV foi capaz de amenizar esses efeitos para a progênie.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, H. E. Mesangial Cell Biology. **Experimental Cell Research**, v. 318, p. 979-985, 2012.
- AHMED, O. M. et al. **Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: The developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system.** International Journal of Developmental Neuroscience, v. 30, p. 517-537, 2012.
- AHMED, O. M. et al. **Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions.** International Journal of Developmental Neuroscience, v. 28, p. 437-454, 2010.
- ALBRAHIM, T.; ROBERT, A. **Renal protective effects of grape seed extract treatment against Eltroxin-induced hyperthyroidism, kidney damage, and oxidative stress in male mice.** Environmental Science and Pollution Research, v. 27, 2020.
- AMARAL, C. L. et al. **Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.** Archives of Toxicology, v. 82, p. 363–370, 2008.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. **Low birth weight and hypertension.** BMJ Best Practice, v. 297, n. 6641, p. 134-135, 1988.
- BARRETO-CHAVES, M. L. M. et al. **The crosstalk between thyroid hormones and the Renin–Angiotensin System.** Vascular Pharmacology, v. 52, p. 166-170, 2010.
- BASU, G; MOHAPRATA, A. **Interactions between thyroid disorders and kidney disease.** Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, v. 16, 2012.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. **Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.** Nature Reviews in Drug Discovery, v. 5, p. 493–506, 2006.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. **Fisiologia.** 7^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2018.
- BOHLE, A. et al. **Significance of Tubulointerstitial Changes in the Renal Cortex for the Excretory Function and Concentration Ability of the Kidney: A Morphometric Contribution.** American Journal of Nephrology, v. 4, p. 421-433, 1987.
- BOLKINI, Y. et al. **Costus Root Extract Alleviates Blood Biochemical Derangements of Experimentally-Induced Hypo- and Hyperthyroidism in Mice.** Annual Research & Review in Biology, v. 31, p. 1-10, 2019.
- 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, p. 49-54, 1994.
- CAPÓ, L. et al. **The Effect of Hyperthyroidism on Capillarity and Oxidative Capacity in Rat Soleus and Gastrocnemius Muscles.** Journal of Physiology, v. 342, p. 1-14, 1983.
- CARE, A. S. et al. **Perinatal Resveratrol Supplementation to Spontaneously Hypertensive Rat Dams Mitigates the Development of Hypertension in Adult Offspring.** Development Programing, p. 829-830, 2016.
- CARLÉ, A. et al. **Epidemiology of nodular goitre: Influence of iodine intake.** Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014.
- CARNEIRO-RAMOS, M. S. et al. **Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism.** Peptides, v. 27, p. 2942-2949, 2006.

- CELIS, J. E.; CELIS, A. **Cell cycle dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 82, p. 3262-3266, 1985.
- CELSING, F. et al. **Effect of hyperthyroidism on fibre-type composition, fibre area, glycogen content and enzyme activity in human skeletal muscle.** Clinical Physiology, v. 6, p. 171-181, 1986.
- CHESEREK, M. J. et al. **Cardio-protective effects of Lipoic acid, Quercetin and Resveratrol on oxidative stress related to thyroid hormone alterations in long-term obesity.** Journal of Nutritional Biochemistry, 2016.
- CHOUDHURY, S. et al. **Experimentally induced hypo- and hyperthyroidism influence on the antioxidant defense system in adult rat testis.** Andrologia, v. 35, n. 3, p. 131-140, 2003.
- COOPER, D. S.; LAUBERG, P. **Hyperthyroidism in pregnancy.** Lancet, Diabetes Endocrinology, v. 1, p. 239-249, 2013.
- CRUNKHORN, S.; PATTI, E. **Links between Thyroid Hormone Action, Oxidative**
- DEN-HOLLANDER, J. G. et al. **Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function.** Clinical Endocrinology, v. 62, p. 423-427, 2005.
- DIEKMAN M. J. et al. **Endocrine factors related to changes in total peripheral vascular resistance after treatment of thyrotoxic and hypothyroid patients.** European Journal of Endocrinology, v. 144, p. 339-346, 2001.
- DIZAYE, K; MUSTAFA, Z. A. **The effect of eplerenone on the renin-angiotensin-aldosterone system of rats with thyroid dysfunction.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2019.
- DOUSDAMPANIS, P. et al. **The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease.** The International Journal of Artificial Organs, v. 37, p. 1-12, 2014.
- DUNTAS, L. **Resveratrol and its impact on aging and thyroid function.** Journal of Endocrinology Investigation, v. 34, p. 788-792, 2011.
- DUNTAS, L. **Thyroid Disease and Lipids.** Thyroid, v. 12, 2002.
- EDDY, A. A. **Molecular insights into renal interstitial fibrosis.** Journal of American Society of Nephrology, v.7, p. 2495-2508, 1996.
- EMMANUEL D. S., et al. **Mechanism of impaired water excretion in the hypothyroid rat.** Journal of Clinical Investigation, v. 54, p. 926-934, 1964.
- FERREIRA, E. et al. **Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, p. 1245-1249, 2007.
- FLORSHEIM, W.H. **Control of thyrotropin Secretion in Handbook of Physiology,** v. 4, p. 449-467, American Physiological Society, 1974.
- FOGO, A. B. **Causes and Pathogenesis of Focal Segmental Sclerosis.** Nature Reviews, v. 11, 2015.
- FRANÇA-SILVA, N. et al. **Diabetes and pregnancy in Wistar rats: renal effects for mothers in the postpartum period.** Journal of Developmental Origins of Health and Disease, v. 14, p. 1-10, 2017.
- FUJITA, K. et al. **Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts.** Molecular Medicine Reports, v. 16, p. 2881-2886, 2017.
- FUKUCHI, M. et al. **Evidence for a deficient pancreatic h-cell response in a rat model of hyperthyroidism.** Life Sciences, v. 71, p. 1059-1070, 2002.
- GIULIANI, C. et al. **Resveratrol has anti-thyroid effects both in vitro and in vivo.** Food and Chemical Toxicology, v. 107, p. 237-247, 2017.

- GIULIANI, C. **Resveratrol Inhibits Sodium/Iodide Symporter Gene Expression and Function in Rat Thyroid Cells.** Plos One, v. 9, 2014.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Elsevier, 13^a ed., 2017.
- HALL, P. A. et al. **Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms.** Journal of Pathology, v. 162, p. 285-294, 1990.
- HOLTHOFF, J. H. et al. **Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury.** Kidney International, 2012.
- HOU, C. et al. **The Effects of Resveratrol in the Treatment of Metabolic Syndrome.** International Journal of Molecular Sciences, v. 20, 2019.
- HOWIE, A. J. et al. **Measurement of proliferation in renal biopsy specimens: Evidence of subclinical tubular damage in the nephrotic syndrome.** Nephrology, Dialysis, Transplantation, v. 10, p. 2212-2218, 1995.
- KHEMICHIAN, S; FONG T. **Hepatic Dysfunction in Hyperthyroidism.** Gastroenterology Hepatology, v. 5, 2011.
- KITADA, M.; KOYA, D. **Renal Protective Effects of Resveratrol.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2013.
- KLIEM, V. et al. **Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats.** Kidney International, v. 49, p. 666-678, 1996.
- KLION, F. M. et al. **The Effect of Altered Thyroid Function on the Ultrastructure of the Human Liver.** The American Journal of Medicine, v. 50, 1971.
- KOBORI, H. et al. **Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy in rats.** Journal of Endocrinology, v. 1, p. 9–14, 1998.
- KOENIG R. J. **Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease.** Thyroid, v. 1, p. 835–840, 2005.
- KOHRLE, J. **Thyroid Hormones and Derivatives: Endogenous Thyroid Hormones and Their Targets.** Methods in Molecular Biology, vol. 1801, 2018.
- LANGLEY-EVANS, S. C. **Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review.** Journal of Human Nutrition and Dietetics, 2014.
- LANGSTON, C. E.; REINE, N. J. **Hyperthyroidism and the Kidney.** Clinical Techniques in Small Animal Practice, v. 21, p. 17-21, 2006.
- LIN, T. Y. et al. **Incidence of Abnormal Liver Biochemical Tests in Hyperthyroidism.** Clinical Endocrinology, v. 5, p. 755–759, 2017.
- LINO, C. A. et al. **Maternal hyperthyroidism alters the pattern of expression of cardiac renin-angiotensin system components in rat offspring.** Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, v. 15, p. 52-60, 2014.
- MALESPIN, M; NASSRI, A. **Endocrine Diseases and the Liver: An Update.** Clinical Liver Disease, v. 23, p. 233-246, 2019.
- MANCINI, A. et al. **Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation.** Mediators of Inflammation, 2016.
- MARCINIAK, A. et al. **Fetal programming of the metabolic syndrome.** Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, v. 56, p. 133-138, 2017.

- MARQUEZ, M. G. et al. **Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development.** *Anatomy Embryology*, v. 5-6, 2002.
- MARTIN J. B. et al. **Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothalamic lesions.** *Endocrinology*, v. 87, p. 1032-1039, 1970.
- MICHAEL U. F., et al. **Renal handling of sodium and water in the hypothyroid rat.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 51, p. 1405–1412, 1972.
- MITCHELL J. E et al. **Thyroid Function in Heart Failure and Impact on Mortality.** *JACC Heart Failure*, v. 1, p. 48-55, 2013.
- MOGULKOC, R. et al. **Effects of Hyperthyroidism Induced by L-Thyroxin Administration on Lipid Peroxidation in Various Rat Tissues.** *Acta Biologica Hungarica*, v 57, p. 157-163, 2006.
- MONTENEGRO J. et al. **Changes in renal function in primary hypothyroidism.** *American Journal of Kidney Disease*, v. 27, p. 195-198, 1996.
- MONTIEL, M. et al. **Angiotensin Converting Enzyme in Hyper and Hypothyroid Rats.** *Hormone and Metabolic Research*, v. 19, 1985.
- MULLUR, R et al. **Thyroid Hormone Regulation of Metabolism.** *Physiology Reviews*, v. 94, p. 355-382, 2013.
- MUNOZ, J. L. **Fetal thyroid disorders: Pathophysiology, diagnosis and therapeutic approaches.** *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 2018.
- NATHANIEL, D. R. **Folliculogenesis in the Neonatal Thyroid Gland of the Rat.** *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*, 1986.
- NIGAM, S. K. et al. **Development and maturation of the kidney.** *The Kidney*, p. 72-98, 1996.
- NIKKILA, E.; KEKKI, M. **Plasma Triglyceride Metabolism in Thyroid Disease.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 51, 1972.
- NILSSON, N.; FAGMAN, H. **Development of the thyroid gland.** *Development*, v. 144, p. 2123-2140, 2017.
- ORTIGA-CARVALHO, T. M et al. **Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis.** *Comprehensive Physiology*, v. 6, 2016.
- OSUNA, P. M. et al. **Hyperthyroidism and the Heart.** *Journal of Houston Methodist Hospital*, 2017.
- OURIQUE, G. M. et al. **Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defenses in the testes of hyperthyroid rats.** *Reproductive Toxicology*, v. 37, 2013.
- PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. **Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats.** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2008.
- PANNU, N.; BHATNAGAR, A. **Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 109, 2019.
- RAMPRASAD, M. et al. **Thyroid disorders in pregnancy.** *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 16, 2012.
- RAUF, A. et al. **Resveratrol as an Anticancer Agent: A Review.** *Clinical Reviews in Food and Science Nutrition*, 2017.
- RAVAROTTO, V. et al. **Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle.** *Life Sciences*, v. 210, p. 125-131, 2018.

- RAZVI, S. et al. **Thyroid Hormones and Cardiovascular Function and Diseases**. Journal of the American College of Cardiology, v. 71, n. 16, 2018.
- REES, D. A.; SCANLON, M. F. **TSH – Thyroid-Stimulating Hormone**. Encyclopedia of Endocrine Diseases, v. 4, 2004.
- REIN, J.; BADER, M. **Renin-Angiotensin System in Diabetes**. Protein & Peptide Letters, v. 24, 2017.
- RESCH, U. G. et al. **Antioxidant status in thyroid dysfunction**. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 40, n. 11, p. 1132–1134, 2002.
- RIJNTJES, E. et al. **Dietary-Induced Hyperthyroidism Marginally Affects Neonatal Testicular Development**. Journal of Andrology, v. 29, 2008.
- RIZOS, C. V. et al. **Effects of Thyroid Dysfunction on Lipid Profile**. The Open Cardiovascular Medicine Journal, v. 5, p. 76-84, 2011.
- RODRIGUES-PEREIRA, P. et al. **Relevant Dose of the Environmental Contaminant, Tributyltin, Promotes Histomorphological Changes in the Thyroid Gland of Male Rats**. Molecular and Cellular Endocrinology, 2019.
- ROSE, S. R.; CHUANG, J. S. **TSH Function and Secretion**. Elsevier, 2017.
- ROSS, D. et al. **2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis**. Thyroid, v. 26, 2016.
- SAHOO, D. K. et al. **Protective effects of vitamin E and curcumin on L-thyroxine-induced rat testicular oxidative stress**. Chemico-Biological Interactions, 2008.
- SAHU, A.; KASOJU, N. **Fluorescence Study of the Curcumin-Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells**. Biomacromolecules, v. 9, 2008.
- SCHWEIZER, U. **New insights into the structure and mechanism of iodothyronine deiodinases**. Journal of Molecular Endocrinology, v. 55, p. 37–52, 2015.
- SHARMA, S. et al. **Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats**. Pharmacology, v. 76, p. 69–75, 2006.
- SHEEN, J. et al. **Combined maternal and postnatal high-fat diet leads to metabolic syndrome and is effectively reversed by resveratrol: a multiple organ study**. Scientific Reports, v. 8, 2018.
- SOMNEZ, E. et al. **Hyperthyroidism influences renal function**. Endocrine, 2019.
- SPARKS, M. et al. **Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology**. Comprehensive Physiology, v. 4, 2014.
- STERRET, M. **Maternal and Fetal Thyroid Physiology**. Clinical Obstetrics and Gynecology, v. 62, p. 302-307, 2019.
- SUHER, M. et al. **Relation of thyroid dysfunction, thyroid autoantibodies, and renal function**. Renal Failure, v. 27, p. 739-742, 2005.
- SUZUKI, K. **The developing world of DOHaD**. Journal of Developmental Origins of Health and Disease, p. 1-4, 2017.
- SYME, H. M. et al. **Cardiovascular and Renal Manifestations of Hyperthyroidism**. Veterinary Clinics, v. 37, p. 723-743, 2007.
- TAKAOKA M. **Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum***. Chemical Society of Japan, v. 60, p.1090–1100, 1939.
- TAYLOR R. E.; FREGLY, M.J. **Renal response of propylthiouracil-treated rats to injected mineralocorticoids**. Endocrinology, v. 75, p. 33– 41, 1964.

- TAYLOR, P. N. et al. **Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism.** *Nature Reviews*, v. 14, 2018.
- UPADHYAY, G. et al. **Severe Hyperthyroidism Induces Mitochondria Mediated Apoptosis in Rat Liver.** *Hepatology*, v. 39, 2004.
- VAN-DER-SPEK, A. H. et al. **The classic pathways of thyroid hormone metabolism.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, p. 29-38, 2017.
- VARAS, S. M. et al. **Hyperthyroidism Affects Lipid Metabolism in Lactating and Suckling Rats.** *Lipids*, v. 36, 2001.
- VARGAS, F et al. **Vascular and Renal Function in Experimental Thyroid Disorders.** *European Journal of Endocrinology*, v. 154, p. 197–212, 2006.
- VARGAS-URICOECHEA, H. et al. **Thyroid Dysfunction and Heart Failure: Mechanisms and Associations.** *Current Heart Failure Reports*, 2017.
- VEGA, C. C. et al. **Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring.** *Journal of Physiology*, p.1483–1499, 2016.
- VENDITTI, P. et al. **Vitamin E management of oxidative damage-linked dysfunctions of hyperthyroid tissues.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 70, n. 17, p. 3125–3144, 2013.
- VENEDIKTOVA, N. I. et al. **Energy metabolism and oxidative status of rat liver mitochondria in conditions of experimentally induced hyperthyroidism.** *Mitochondrion*, v. 52, p. 190-196, 2020.
- WALLING, B. E. et al. **Atlas of Histology of the Juvenile Rat.** Elsevier, p. 257-291, 2016.
- WANG, H. et al. **Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research?** *Heart Failure Reviews*, v. 17 2012.
- WEYEMI, U. et al. **Intracellular expression of reactive oxygen species-generating NADPH oxidase NOX4 in normal and cancer thyroid tissues.** *Endocrine-Related Cancer*, v. 17, n. 1, p. 27–37, 2010.
- YANG, G. et al. **Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes.** *Journal of Cardiovascular Disease*, v. 1, 2010.
- ZARKOVIC, N. **Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology.** *Cells*, v. 3, 2020.
- ZHANG, G. et al. **Myofibroblasts and progression of experimental glomerulonephritis.** *Experimental Nephrology*, v. 3, p. 308-318, 1995.
- ZHENG, S. et al. **Maternal resveratrol consumption and its programming effects on metabolic health in offspring mechanisms and potential implications.** *Bioscience Reports*, v. 38, 2018.
- ZHOU, Z. Q. et al. **Expression levels of alpha-smooth muscle actin in intrarenal arterioles of patients with different stages of chronic kidney disease.** *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, v. 34, 2020.
- ZIMMERMAN, S. E. et al. **Nephronectin regulates Mesangial Cell Adhesion and Behavior in Glomeruli.** *Journal of American Society of Nephrology*, v. 29, 2018.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação dos parâmetros metabólicos, renais e cardiovasculares da prole de ratas Wistar com hipertireoidismo materno: benefícios do Resveratrol”, protocolo nº 051/19, 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 **04 de Outubro de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação dos parâmetros metabólicos, renais e cardiovasculares da prole de ratas Wistar com hipertireoidismo materno: benefícios do Resveratrol” protocol 051/19, 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 October 04th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 20/10/2019 Término: 01/10/2022
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos da linhagem Wistar
Número de animais	364
Peso / Idade	300g – Machos Adultos 180g – Fêmeas Adultas
Sexo	Macho e Fêmea
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 07 de Outubro de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019