



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MARINA INÊS DE OLIVEIRA PRADO

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL (HGE)
SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PROLE SUBMETIDA A UM MODELO
DE ASMA ALÉRGICA**

ARACAJU

2019

MARINA INÊS DE OLIVEIRA PRADO

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL (HGE)
SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PROLE SUBMETIDA A UM MODELO
DE ASMA ALÉRGICA**

Monografia apresentada pela aluna Marina Inês de Oliveira Prado ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como exigência parcial para a obtenção da graduação em Medicina.

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Rabelo dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior

ARACAJU

2019

MARINA INÊS DE OLIVEIRA PRADO

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL (HGE)
SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PROLE SUBMETIDA A UM MODELO
DE ASMA ALÉRGICA**

Monografia apresentada pela aluna Marina Inês de Oliveira Prado ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como exigência parcial para a obtenção da graduação em Medicina.

Aluna: Marina Inês de Oliveira Prado

Orientadora: : Prof. Dra. Patricia Rabelo dos Santos

MARINA INÊS DE OLIVEIRA PRADO

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL (HGE)
SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PROLE SUBMETIDA A UM MODELO
DE ASMA ALÉRGICA**

Monografia apresentada pela aluna Marina Inês de Oliveira Prado ao Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como exigência parcial para a obtenção da graduação em Medicina.

Aprovada em ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

Universidade Federal de Sergipe

RESUMO

Durante a vida intrauterina, o feto necessita de condições adequadas para o seu correto desenvolvimento. Se ocorrer algum insulto ou estímulo diferente, surgem adaptações fisiológicas e metabólicas que podem repercutir de maneira negativa na vida adulta deste indivíduo. Esse conceito é conhecido como programação fetal. Sabe-se que o feto depende dos hormônios tireoideanos maternos para o seu correto crescimento. Esses exercem ações fisiológicas essenciais no funcionamento dos sistemas biológicos, com destaque para o desenvolvimento do sistema imunológico. Baseado em trabalhos que mostraram que o hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) altera a resposta imunológica e que as condições adversas durante o desenvolvimento intrauterino são importantes programadoras da susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças alérgicas, como a asma, o objetivo desta pesquisa foi investigar a influência do HGE na resposta inflamatória da prole submetida a asma alérgica. O HGE foi induzido em camundongos Swiss prenhas pela administração de Metimazol 0,02% na água de beber, do 9º dia gestacional até o dia do parto. Para verificar a influência do HGE na inflamação pulmonar, proles de mães hipotireoideanas (PMH) e eutireoideanas (PME) foram submetidas a um modelo animal de asma alérgica induzida por ovoalbumina (AAIO). Os dados obtidos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As análises foram feitas utilizando a ANOVA two-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. O nível crítico fixado foi de 5%. A PMH-OVA apresentou menor número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) ($p < 0,001$); houve, também, menor atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão ($p < 0,001$) e menor conteúdo de peroxidase eosinofílica no LBA ($p < 0,05$), comparados à PME-OVA. Conclui-se que o HGE teve efeito inibitório sobre o recrutamento de leucócitos totais para o lavado broncoalveolar (LBA), atividade da MPO no pulmão e conteúdo de peroxidase eosinofílica no LBA da prole submetida ao modelo de asma alérgica induzida por ovoalbumina.

PALAVRAS-CHAVE: programação fetal; hipotireoidismo gestacional; asma; inflamação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAIO	Asma Alérgica Induzida por Ovoalbumina
ANOVA	Análise de variância
BSA	Bovine Serum Albumin
CD4+	Células T CD 4
CD8+	Células T CD 8
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
D1, D2, D3	Desiodases tipo 1,2 e 3
DEHAL1	Dehalogenase iodotirosina
DG	Dia gestacional
DIT	Diiodotirosina
DP	Dia do parto
DPN	Dia pós-natal
DUOX 1 e 2	Dual-oxidase 1 e 2
EPO	Peroxidase eosinofílica
H2O2	Peróxido de hidrogênio
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HGE	Hipotireoidismo Gestacional Experimental
HT	Hormônios tireoideanos

HTBA	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IgE	Imunoglobulina Específica
IL-2	Interleucina - 2
IL-4	Interleucina - 4
IL-5	Interleucina - 5
IL-12	Interleucina - 12
IL-13	Interleucina - 13
LBA	Lavado Broncoalveolar
MCT8	Monocarboxylate Transporter 8
MIT	Monoiodotirosina
MPO	Mieloperoxidase
MTZ	Metimazol
NIS	Simportador sódio-iodo
NK	Células Natural Killer
OPD	O-fenilenodiamina dihidroclorato
OVA	Ovoalbumina
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salina
PDS	Pendrina
PME	Proles de mães eutireoideanas
PMH	Proles de mães hipotireoideanas
SNC	Sistema Nervoso Central

T3	Triiodotironina ou 3,5,3' - triiodotironina
T4	Tiroxina ou 3,5,3' , 5' – tetraiodotironina
TBG	Tyroxine-Binding Globulin
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TSHR	Receptor de TSH

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Influência do HGE na massa corpórea de fêmeas prenhas, após a cópula (0 DG), nove dias após a cópula (9 DG) e no dia do parto (DP).40
- Figura 2:** Efeito do HGE sobre a massa corpórea da PME e PMH aos 7 DPN (Painel A), 14 DPN (Painel B), 21 DPN (Painel C), 30 DPN (Painel D) e 60 DPN (Painel E).41
- Figura 3:** Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre o número total de células no lavado broncoalveolar (BAL) da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.....42
- Figura 4:** Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.....43
- Figura 5:** Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado broncoalveolar (BAL) da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Relação dos grupos experimentais do protocolo de asma alérgica induzida por ovoalbumina (OVA) - AAIIO.....	37
--	----

Sumário

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 Programação fetal	12
1.2 Hormônios Tireoideanos	13
1.3 Função tireoideana na gestação	14
1.4 Hipotireoidismo gestacional.....	16
1.5 Asma.....	16
REFERÊNCIAS.....	19
2 NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	21
3 ARTIGO ORIGINAL	30
RESUMO	31
1 INTRODUÇÃO	33
2 OBJETIVO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais.....	36
3.2 Acasalamento programado	36
3.3 Indução do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE)	36
3.4 Asma alérgica induzida por ovoalbumina (AAIO).....	37
3.4.1 Modelo de Inflamação Pulmonar.....	37
3.4.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios	38
3.4.2.1 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), preparo e quantificação celular	38
3.4.2.2 Ensaio da Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	38
3.4.2.3 Ensaio da Determinação da Peroxidase Eosinofílica (EPO) no LBA.....	39
3.5 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Acompanhamento da massa corpórea das fêmeas prenhas e massa corpórea da prole	40
4.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios na prole submetida a um modelo de asma alérgica....	42
5 DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO	50

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Programação fetal

A partir de um estudo na década de 80 na Inglaterra e no País de Gales, o epidemiologista David Barker observou que havia uma relação entre a mortalidade infantil dos anos 1921-1925 com a mortalidade por doença cardíaca isquêmica entre 1968-1978. Sugeriu que isso estaria relacionado com a má nutrição durante a vida pré-natal e pós-natal precoce. Com isso, elocubrou que condições adversas durante a vida fetal e na infância poderiam tornar os indivíduos mais susceptíveis a desenvolverem doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER, 1986).

Posteriormente, em um estudo realizado no Hospital Universitário de Hensínquia, observou que o pequeno tamanho ao nascer e durante a infância, seguido de um acelerado ganho de peso dos três aos 11 anos, estavam associados à incidência de doença coronariana, diabetes tipo 2 e hipertensão na vida adulta. Isso pode ser explicado por dois fenômenos biológicos: plasticidade do desenvolvimento e crescimento compensatório. Backer, em seu estudo, cita a chamada “plasticidade fenotípica”, conceito atribuído à capacidade do nosso organismo de originar estados fisiológicos e morfológicos distintos em resposta aos diferentes estímulos externos durante o desenvolvimento, possibilitando uma adaptação compatível com o ambiente que o feto está sendo exposto (BARKER et al., 2002).

Desde a criação da Teoria de Barker, experimentos realizados com diferentes espécies de mamíferos, tem apoiado a hipótese de que o ambiente intrauterino adverso gera uma programação na fisiopatologia pós-natal. Quando ocorre uma mudança no ambiente intrauterino, o feto se adapta para sobreviver. No entanto, essa alteração pode persistir além do ponto de adaptação reversível do feto, gerando uma condição irreversível que pode induzir doenças na vida adulta (CHEN; ZHANG, 2011).

Estudo recente com o objetivo de esclarecer se o hipotireoidismo gestacional tem relação com o aumento de incidência de Transtorno de Espectro Autista nas crianças, mostrou que o Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) induzido pela administração de metimazol (MTZ) não induz comportamentos da prole que se assemelham ao autismo. No

entanto, mostrou que os machos expostos ao MTZ, ao reconhecerem objetos, passavam mais tempo explorando um objeto estranho do que um já conhecido em comparação com os machos do grupo controle (MELANCIA et al., 2017).

1.2 Hormônios Tireoideanos

A tireoide é uma glândula formada por unidades funcionais chamadas folículos tireoideanos. Eles possuem em seu interior tireoglobulina iodada (TG), participam da biossíntese dos hormônios tireoidianos (HT), que são o T4 (tiroxina) e o T3 (triiodotironina), e são formados por células epiteliais foliculares polarizadas, os tireócitos. Na membrana apical do tireócito, há quatro moléculas que devem agir mutuamente para ocorrer a biossíntese dos hormônios tireoidianos, que são: o iodeto (absorvido no trato intestinal), a TG, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a tireoperoxidase (TPO). As moléculas de TG que possuem T4 e T3 são armazenadas no lúmen do folículo e, quando ocorre a proteólise dessa molécula, os HT são liberados no sangue (CARVALHO; DUPUY, 2017).

A síntese e a secreção de T4 e T3 é estimulada pelo hormônio tireoestimulante (TSH), liberado pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise, cuja regulação se dá pelo mecanismo de *feedback* negativo. O hipotálamo libera hormônio liberador de tireotrofina (TRH), que estimula a hipófise a secretar TSH (WAJNER et al., 2008). O TSH estimula os receptores acoplados a proteínas G TSHR (presente na membrana dos tireócitos) e aumenta a captação do iodeto através de uma proteína transportadora chamada NIS. Após entrar nos tireócitos, o iodeto é translocado para o lúmen folicular por uma proteína conhecida como pendrina (PDS) e é incorporado às moléculas de tireoglobulina. A TPO, após ser oxidada por uma molécula de H_2O_2 , é responsável pela oxidação iodeto a iodo (organificação) e incorporação do iodo aos resíduos tirosílicos da TG, processo conhecido como iodinação. A enzima que produz o H_2O_2 é a dual oxidase (DUOX2), uma NADPH oxidase dependente (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016).

A síntese de T3 e T4 resulta do processo de iodinação, em que são formados resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT) que se ligam para formarem os HT, através de uma transferência de um grupo iodofenoxil de um MIT ou DIT “doador” para um resíduo DIT “aceptor”. Antes de serem liberados dos tireócitos, os hormônios tireoidianos, via

protólise, são liberados da TG, que libera também MIT e DIT. Esses resíduos, então, são desiodados pela dehalogenase iodotirosina (DEHAL1), processo importante para fornecer uma fonte sustentada de iodeto intratireoidiano. O mais importante transportador dos HT para fora da célula tireoideana é o monocarboxilato SLC16A2 8 (MCT8) (CARVALHO; DUPUY, 2017; DI COSMO et al., 2010).

A tireoglobulina iodinada que contém MIT, DIT, T3 e T4 é armazenada no colóide e a liberação dos hormônios é feita através da endocitose e digestão lisossomal da tireoglobulina na célula folicular. O hormônio biologicamente ativo é o T3, mas o T4 é o mais produzido. Nos tecidos periféricos, as iodotironinas desiodases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) catalizam a transformação metabólica do hormônio tireoidiano, convertendo T4 a T3. Para agirem nas células alvo, há sistemas transportadores específicos para os hormônios tireoidianos nos tecidos. A captação celular dos HT depende de energia, temperatura e gradiente de Na^+ , ocorrendo a translocação do hormônio pela membrana. No entanto, em sítios de baixa afinidade, o transporte é feito por dois tipos principais de transportadores: transportadores de ânions orgânicos e transportadores de aminoácidos tipo L (WAJNER et al., 2008).

1.3 Função tireoideana na gestação

Durante a gravidez, ocorre alterações na produção dos hormônios tireoidianos que são essenciais para o desenvolvimento do feto, principalmente no primeiro trimestre de gestação. Nesse período, ocorre o aumento na produção da gonadotrofina coriônica (hCG), a qual possui homologia com o TSH e, por esse motivo, ambos os hormônios conseguem se ligar aos receptores de TSH localizados nos tireócitos, aumentando consideravelmente a produção de T3 e T4, ficando a concentração sérica do T4 1,5 vezes maior. Devido a esse aumento, ocorre inibição do eixo hipotálamo-hipófise, mecanismo conhecido como feedback negativo, diminuindo a secreção do TSH. Por isso, no primeiro trimestre (8-14 semanas), o TSH fica mais baixo, mas aumenta durante o segundo e o terceiro trimestre, quando a produção da hCG diminui. Além disso, durante a primeira metade da gestação até o termo, o estrogênio aumenta a síntese hepática da globulina transportadora da tiroxina (TBG) tornando sua concentração no sangue maior. Assim, a concentração de T3 e T4 livre diminui e as concentrações séricas totais se elevam (BUDENHOFER et al., 2013).

Os hormônios tireoidianos durante a gestação são importantes para o desenvolvimento do cérebro, fígado, ossos, coração e músculos. Eles são necessários para a diferenciação, migração, crescimento e função das células. Já foi mostrado em alguns estudos que a deficiência de HTs nas 12 primeiras semanas de gestação está associada à atrasos cognitivos e neuromotores em crianças de 1 e 2 anos. Além disso, já foi observado uma associação do hipotireoidismo gestacional com Transtorno de Deficit de Atenção, com Hiperatividade e esquizofrenia. Crianças filhas de mães que tiveram hipotireoidismo na gestação, tem maiores chances de desenvolver essas patologias. Além disso, foi mostrado que o sistema nervoso central do feto depende de concentrações adequada dos hormônios tireoidianos durante a gestação para o seu correto desenvolvimento. Em estudos realizados com animais, observou-se que proles gestadas sob condição de hipotireoidismo materno tem alterações no hipocampo, como diminuição na proporção de fibras de células gliais maduras (OPAZO et al., 2017).

Os hormônios tireoideanos também possuem importante papel no funcionamento do sistema imunológico. O TSH faz parte da modulação deste sistema e já foi encontrado receptores do TSH em células imunes. Isso permite que esse hormônio melhore a função imunológica do organismo, como a capacidade fagocitária e a secreção de citocinas pró inflamatórias pelas células dendríticas e também a capacidade de proliferação de células NK (NAKAMURA et al., 2007).

Além do TSH, os hormônios T3 e T4 também possuem participação no sistema imune. O T4 diminui significativamente a atividade de células NK, como foi mostrado em pesquisas com modelo murino que apresentavam hipertireoidismo, sugerindo que esse hormônio regula indiretamente as células NK através da citocina IL-2 (OPAZO et al., 2017a). Já o T3, induz a maturação de células dendríticas, o que provoca aumento da liberação de moléculas co-estimulatórias e de IL-12. Ademais, o T3 possui ação sobre os macrófagos, polarizando-o para os macrófagos classicamente ativados (M1), ou seja, aqueles que promovem a inflamação (PERROTTA et al., 2014).

Além disso, experimentos realizados com uma variedade de animais sugerem que no hipotireoidismo a resposta inflamatória torna-se maior, pois foi mostrado um aumento da proporção das células T helper em relação as células T supressoras. Ademais, estudos com ratos hipotireoideanos, mostrou que essa endocrinopatia altera o metabolismo lipídico nas

células polimorfonucleadas, que são importantes para o funcionamento das células imunes (OPAZO et al., 2017).

1.4 Hipotireoidismo gestacional

O hipotireoidismo gestacional na maioria das vezes é causado por tireoidite auto-imune ou por destruição da glândula, dificilmente por alterações hipotalâmica-hipofisárias (COSTA et al., 2004). Estima-se que 2% a 3% das mulheres apresentam hipotireoidismo durante a gestação (NATHAN; SULLIVAN, 2014).

Mulheres com hipotireoidismo gestacional apresentam frequentemente mais abortos espontâneos, anemia, hipertensão gestacional, descolamento placentário, hemorragia pós parto, morte fetal intra-uterina e pré-eclampsia. Além disso, os fetos têm maiores chances de nascerem prematuros, com baixo peso ou com malformações gênicas (BUDENHOFER et al., 2013). O hipotireoidismo apresenta sintomas como fadiga, pele seca, fraqueza muscular, depressão e muitos dos sintomas dessa doença são confundidos com os da gravidez (OPAZO et al., 2017).

O *American College of Obstetricians and Gynecologists* não recomenda a triagem tireoidiana em todas as gestantes, apenas nas grávidas que apresentam alto risco para disfunção na tireóide. Assim, como o hipotireoidismo gestacional possui sintomas parecidos com os da gravidez, seu diagnóstico se torna essencialmente laboratorial (ANDRADE et al., 2005) e muitas mulheres desenvolvem esse quadro patológico e não são tratadas.

1.5 Asma

O termo médico asma deriva do grego e surgiu por volta de 400 a.c. com Hipócrates. Essa patologia apresenta diferentes fenótipos e manifestações. Por isso, atualmente possui uma definição mais complexa do que há milhares de anos e está cada vez mais sendo reconhecida como uma síndrome (MASLAN; MIMS, 2014).

A asma é caracterizada pela obstrução variável das vias aéreas, associado à broncoconstrição, inflamação da mucosa e secreção de muco. É uma doença heterogênea,

tanto clinicamente quanto na sua origem molecular, que compromete o trato respiratório inferior e tem como sintomas clássicos aperto no peito, sibilância, dispneia e tosse. Esses sintomas aparecem quando o indivíduo é exposto à alérgenos, irritantes, infecções do trato respiratório superior e exercício físico, por exemplo. Fatores socioeconômicos, exposição ao fumo e infecções virais nos 3 primeiros anos de vida, também são considerados fatores de risco (MCCRACKEN et al., 2017).

A genética da asma é complexa e não existe apenas um gene para explicar toda a fisiopatologia da doença. Acredita-se que a asma apareça em indivíduos geneticamente suscetíveis associado às exposições ambientais. A atopia é frequentemente identificada como um forte fator de risco para o desenvolvimento dessa patologia (MASLAN; MIMS, 2014).

Epidemiologicamente, é mais prevalente e tem maior mortalidade em negros do que em brancos. Seu início é mais comum em crianças e nos adultos jovens, mas pode ocorrer em qualquer idade (MCCRACKEN et al., 2017). Essa doença tem grande impacto no Brasil, pois gera altos custos para a sociedade e ainda há números elevados de hospitalizações e mortes por ano no país. Em 2013, 2047 pessoas morreram de asma no Brasil e houve mais de 120.000 hospitalizações por ano (CARDOSO et al., 2017).

Na patogênese da asma, a inflamação envolve diferentes células, como eosinófilos, linfócitos, mastócitos e neutrófilos. A resposta inflamatória é mediada por IgE após o contato com o alérgeno. Primeiro ocorre a fase de sensibilização e o IgE se liga aos mastócitos que é ativado pela reexposição ao alérgeno. Posteriormente, ocorre liberação de histamina, infiltração de linfócitos, principalmente Th2 e liberação de IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas estimulam os mastócitos, causam eosinofilia, promovem leucocitose e estimulam a produção de IgE. Essa resposta inflamatória provoca obstrução, infiltração e edema na mucosa, secreção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas (MCCRACKEN et al., 2017; HAMELMANN; GELFAND, 2001).

A asma atópica ou alérgica está associada a rinite alérgica e dermatite atópica. Um estudo de Corren identificou a presença de rinite em 78% das pessoas com asma e a presença de asma em 38% dos pacientes com rinite (MASLAN; MIMS, 2014).

Os sintomas são episódicos e reversíveis, mas com o agravamento da doença a longo prazo, pode ocorrer hipertrofia e hiperplasia do músculo liso das vias aéreas,

espessamento da membrana sub-basal, edema e fibrose subepitelial e proliferação e dilatação dos vasos sanguíneos. A broncoconstrição é a principal causa dos sintomas obstrutivos e pode ser induzida por várias vias, como por alérgenos, causada por degranulação de mastócitos, dependente de IgE, que induz liberação de histamina, triptase, leucotrienos e prostaglandinas (MASLAN; MIMS, 2014;HOLGATE, 2012).

Confirmando que exposições ambientais durante a vida pré-natal pode aumentar o risco de asma no indivíduo, um estudo realizou um experimento usando um modelo de asma alérgica induzida por alérgenos de ácaros relacionado à fumaça do tabaco. Os dados sugeriram que a exposição ambiental intrauterina à fumaça do tabaco pode aumentar o risco de asma do indivíduo (CHRISTENSEN et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. J. O. et al. Detection of subclinical hypothyroidism in pregnant women with different gestational ages. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 923–929, dez. 2005.
- BARKER, D. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. **The Lancet**, v. 327, n. 8489, p. 1077–1081, maio 1986.
- BARKER, D. J. P. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 1235–1239, dez. 2002.
- BUDENHOFER, B. K. et al. Thyroid (dys-)function in normal and disturbed pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 287, n. 1, p. 1–7, jan. 2013.
- CARDOSO, T. DE A. et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, jun. 2017.
- CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 458, p. 6–15, 15 dez. 2017.
- CHEN, M.; ZHANG, L. Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 23, p. 1007–1018, 1 dez. 2011.
- CHRISTENSEN, S. et al. Prenatal environmental tobacco smoke exposure increases allergic asthma risk with methylation changes in mice: Prenatal ETS Exposure and Asthma Risk. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 6, p. 423–433, jul. 2017.
- COSTA, S. M. DA et al. Hipotireoidismo na gestação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, n. 4, p. 351–358, dez. 2004.
- DI COSMO, C. et al. Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 9, p. 3377–3388, set. 2010.
- HAMELMANN, E.; GELFAND, E. W. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? **Immunological Reviews**, v. 179, p. 182–191, fev. 2001.
- HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 673–683, maio 2012.
- MASLAN, J.; MIMS, J. W. What is Asthma? Pathophysiology, Demographics, and Health Care Costs. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 47, n. 1, p. 13–22, fev. 2014.
- MCCRACKEN, J. L. et al. Diagnosis and Management of Asthma in Adults: A Review. **JAMA**, v. 318, n. 3, p. 279, 18 jul. 2017.

MELANCIA, F. et al. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 321, p. 113–122, 15 2017.

NAKAMURA, R. et al. Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 13, p. 1630–1638, 15 dez. 2007.

NATHAN, N.; SULLIVAN, S. D. Thyroid disorders during pregnancy. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 573–597, jun. 2014.

OPAZO, M. C. et al. Imprinting of maternal thyroid hormones in the offspring. **International Reviews of Immunology**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 8 mar. 2017a.

OPAZO, M. C. et al. Imprinting of maternal thyroid hormones in the offspring. **International Reviews of Immunology**, v. 36, n. 4, p. 240–255, 4 jul. 2017b.

ORTIGA-CARVALHO, T. M. et al. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1387–1428, 13 2016.

PERROTTA, C. et al. The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: protective role during inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 230–247, jan. 2014.

WAJNER, S. M. et al. Thyroid hormones and testicular function. **Rev HCPA**, 28 (1): 41-8, 2008

2 NORMAS DE PUBLICAÇÃO

JORNAL BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA

O Jornal Brasileiro de Pneumologia destina-se a publicação de trabalhos científicos referentes à Pneumologia e especialidades correlatas. Os manuscritos podem ser submetidos em português, espanhol ou inglês. Os artigos aceitos, originalmente escritos em português e espanhol, serão traduzidos para o inglês e a versão disponibilizada neste *site*. Serão considerados para publicação, entre outros, trabalhos do tipo artigos originais, comunicações breves e cartas ao editor. Embora artigos de revisão sejam efetuados a convite, se espontaneamente submetidos, poderão ser considerados para publicação, na dependência da avaliação do Conselho Editorial. Pedimos que os autores interessados em submeter um artigo de revisão, o façam apenas após uma consulta ao Editor-Chefe.

Os artigos submetidos que contenham erros significativos de metodologia, ou não se enquadrem nas prioridades editoriais da revista, poderão ser rejeitados diretamente pelo Conselho Editorial, não cabendo recurso. Os demais manuscritos serão avaliados por sistema de revisão por pares. O Jornal Brasileiro de Pneumologia emprega política de anonimato no processo de avaliação, tanto para autores como para revisores. Na confecção do trabalho os autores devem observar rigorosamente as Instruções Redatoriais do jornal. O não cumprimento dessas normas implicará no retorno do artigo para correções, retardando o início do processo de revisão.

Os trabalhos devem ser submetidos exclusivamente por via eletrônica, pelo Sistema de Gestão de Publicações (SGP). Todo trabalho deve ser acompanhado de Carta de Envio assinada por todos os autores, assim como por Declarações de Conflito de Interesse individuais, conforme modelos contidos neste *site*. Tais documentos deverão ser enviados ao jornal pelo correio ou fax.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Pneumologia (JBP) ISSN-1806-3756, publicado de modo contínuo, em seis números ao ano, é um órgão oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, destinado à publicação de trabalhos científicos referentes à Pneumologia e áreas correlatas. O JBP está registrado no PubMed Central (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/2395) e no SciELO (<http://www.scielo.br/jbpneu>).

Os manuscritos serão analisados e, de acordo com definição do Conselho Editorial, serão encaminhados para revisores qualificados, sendo o anonimato garantido no processo de julgamento. Os artigos que não apresentarem mérito suficiente, que contenham erros significativos de metodologia ou não se enquadrem na política editorial do JBP serão rejeitados diretamente pelo Conselho Editorial, não cabendo recurso.

Os artigos podem ser escritos em português, espanhol ou inglês. Todos os artigos serão disponibilizados tanto numa versão em língua latina como também em inglês no site do JBP (www.jornaldepneumologia.com.br). Cada artigo receberá um número de referência na submissão para consulta futura.

Não há taxas para submissão, avaliação e eventual publicação do artigo.

O JBP apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e a divulgação internacional de informações sobre estudos clínicos em acesso aberto. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínicos que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE. O número de identificação deverá ser registrado ao final do resumo.

Dentro desse contexto, o JBP adota a definição de ensaio clínico preconizada pela OMS, que pode ser assim resumida: "qualquer pesquisa que prospectivamente designe seres humanos para uma ou mais intervenções visando avaliar seus efeitos em desfechos relacionados à saúde. Tais intervenções incluem drogas, células e outros produtos biológicos, procedimentos cirúrgicos, radiológicos, dispositivos, terapias comportamentais, mudanças de processos de cuidados, cuidados preventivos, etc."

Estudos com humanos devem incluir, na seção de Métodos, a informação sobre a aprovação da Comissão de Ética Local ou Nacional, preferencialmente com o número de aprovação, e estar de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki. Estudos experimentais em animais devem estar alinhados com preceitos éticos.

Os autores garantem que os artigos submetidos ao JBP não foram publicados anteriormente e não estão sendo avaliados simultaneamente para a publicação em outro(s)

periódico(s). O JBP utiliza o programa **Crossref Similarity Check** (iThenticate) para a avaliação do grau de similaridade com artigos previamente publicados.

CRITÉRIOS DE AUTORIA

A inclusão de um autor em um manuscrito encaminhado para publicação só é justificada se ele contribuiu significativamente, do ponto de vista intelectual, para a sua realização. Fica implícito que o autor participou de pelo menos uma das seguintes fases: 1) concepção e planejamento do trabalho, bem como da interpretação das evidências; 2) redação e/ou revisão das versões preliminares e definitiva; e 3) aprovou a versão final.

A simples coleta e catalogação de dados não constituem critérios para autoria. Igualmente, não devem ser considerados como autores auxiliares técnicos que fazem a rotina, médicos que encaminham pacientes ou interpretam exames de rotina e chefes de serviços ou departamentos não diretamente envolvidos na pesquisa. A essas pessoas poderá ser feito um agradecimento especial. A contribuição de cada autor para o trabalho e eventuais agradecimentos devem constar da página de identificação (*title page*) obrigatoriamente (ver no item Página de Identificação). Os conceitos contidos nos manuscritos são de responsabilidade exclusiva dos autores.

Com exceção de trabalhos considerados de excepcional complexidade, a revista considera 10 o número máximo aceitável de autores para os artigos originais. No caso de haver um maior número de autores, enviar carta à Secretaria do JBP descrevendo a participação de cada um no trabalho.

APRESENTAÇÃO E SUBMISSÃO DOS MANUSCRITOS

Os manuscritos deverão ser obrigatoriamente encaminhados via eletrônica a partir do sistema de submissão ScholarOne <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbpneu-scielo>. As instruções e o processo de submissão estão descritos abaixo: O formulário de transferência de direitos autorais deve ser assinado à caneta por todos os autores e deve ser carregado como um arquivo complementar junto ao manuscrito enviado. O modelo está disponível aqui: <http://jornaldepneumologia.com.br/sgp/declaracaodeconflitointeresses.zip>.

Pede-se aos autores que sigam rigorosamente as normas editoriais do JBP, particularmente no tocante ao número máximo de palavras, tabelas, quadros e figuras permitidas, bem como às regras para confecção das referências bibliográficas. A não observância das instruções redatoriais implicará na devolução do manuscrito pela Secretaria do JBP para que os autores façam as correções pertinentes antes de submetê-lo aos revisores.

Instruções especiais se aplicam para a confecção de Diretrizes e Consensos e devem ser consultadas pelos autores antes da confecção desses documentos na homepage do JBP. Diretrizes e Consensos serão publicados como Artigos Especiais, também na modalidade de publicação contínua, em números regulares do JBP.

O JBP reserva o direito de efetuar nos artigos aceitos adaptações de estilo, gramaticais e outras.

ESPECIFICAÇÕES POR TIPO DE ARTIGO

Os manuscritos principais deverão ser submetidos em arquivo Word (.doc ou .docx). Na tabela abaixo, segue um resumo das especificações dos tipos de artigos a serem submetidos.

	Revisão		Artigo	Ensaio	Comunicação	Carta	Correspon-	Editorial	Imagens em
	Artigo Original	sistemática e Meta-análise	de revisão	Pictórico	Breve	ao Editor	dência		Pneumologia
N.º máximo de autores	10	6	6	6	5	5	3	3	3
Resumo									
N.º máximo de palavras	250 com estrutura	250 com estrutura	250 sem estrutura	250 sem estrutura	100 sem estrutura	sem resumo	sem resumo	sem resumo	sem resumo

N.º máximo de palavras	3.000	5.000	5.000	3.000	1.500	1.000	500	1.000	200
N.º máximo de referências	40	60	60	30	20	10	3	12	3
N.º de tabelas e figuras	6	8	8	12	2	1	-	1	2

Artigos originais

O texto deve ter entre 2.000 e 3.000 palavras, excluindo resumo, referências e ilustrações (isto é, tabelas, quadros e figuras). Deve conter no máximo 6 ilustrações. O número de referências bibliográficas não deve exceder 40. A sua estrutura deve conter as seguintes partes: Introdução, Métodos, Resultados, Discussão, (Agradecimentos e Contribuição dos Autores somente na title page) e Referências. A seção Métodos deverá conter menção quanto à aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais, ligados a Instituição onde o projeto foi desenvolvido. Nessa seção também deve haver descrição da análise estatística empregada, com as respectivas referências bibliográficas. Ainda que a inclusão de subtítulos no manuscrito seja aceitável, o seu uso não deve ser excessivo e deve ficar limitado às sessões Métodos e Resultados.

Séries de casos

As séries de casos deverão ser publicadas como artigos originais, seguindo suas especificações.

Revisões sistemáticas e meta-análises

O resumo deve ser estruturado da mesma forma que artigos originais. O texto não deve ultrapassar 5.000 palavras, excluindo resumo, referências e ilustrações. O número total

de ilustrações não deve ser superior a 8. O número de referências bibliográficas deve se limitar a 60.

Revisões e Atualizações

Serão realizadas somente a convite do Conselho Editorial. O texto não deve ultrapassar 5.000 palavras, excluindo resumo, referências e ilustrações. O número total de ilustrações não deve ser superior a 8. O número de referências bibliográficas deve se limitar a 60.

Ensaio pictórico

Serão igualmente realizados a convite ou após consulta dos autores ao Conselho Editorial. O texto não deve ultrapassar 3.000 palavras, excluindo referências e ilustrações. O número total de ilustrações não deve ser superior a 12, e as referências bibliográficas não devem exceder 30.

Comunicações Breves

O texto não deve ultrapassar 1.500 palavras, excluindo as referências e ilustrações. O número total de ilustrações não deve exceder 2 e o de referências bibliográficas, 20. O texto deverá ser confeccionado de forma corrida, sem subtítulos.

Cartas ao Editor

Constituem-se em contribuições originais contendo resultados preliminares, não ultrapassando 1.000 palavras e com não mais do que 10 referências bibliográficas e 1 ilustração.

Correspondências

Serão consideradas para publicação comentários e sugestões relacionadas a um artigo anteriormente publicado, não ultrapassando 500 palavras e 3 referências no total.

Editoriais

Serão realizados a convite. O texto não deve ultrapassar 1.000 palavras, excluídas referências e ilustrações. O número total de ilustrações é 1, e as referências bibliográficas não devem exceder 12.

Imagens em Pneumologia

O texto deve ser limitado ao máximo de 200 palavras, incluindo título e corpo do texto, e até 3 referências. É possível incluir até o máximo de 2 figuras, considerando-se que o conteúdo total será publicado em apenas uma página.

Não aceitamos Relatos de Caso.

PREPARO DO MANUSCRITO

Página de identificação (*Title page*)

Ela deve conter o título do trabalho, em português e inglês, nome completo (incluindo nomes do meio sem abreviatura), instituições as quais estão vinculados, endereço completo, inclusive telefone, celular e e-mail do autor correspondente e, se houver, nome do órgão financiador da pesquisa e identificação do protocolo de financiamento. Devem-se incluir os locais onde o estudo foi realizado. Além disso, as informações sobre a contribuição de cada autor para o trabalho e eventuais agradecimentos devem constar aqui. Primeiro o item agradecimentos e depois, o item contribuição dos autores. Essas informações serão publicadas ao final do manuscrito, antes das referências. A página de identificação deve ser enviada como um arquivo a parte em Word, separado do manuscrito principal.

Resumo/Abstract

Deve conter informações facilmente compreendidas, sem necessidade de recorrer-se ao texto, não excedendo 250 palavras. Deve ser feito na forma estruturada para os Artigos Originais e Meta-análises com os seguintes subtítulos: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Quando se tratar de Artigos de Revisão e Ensaio Pictórico, o resumo não deve ser estruturado. Para Comunicações Breves, não deve ser estruturado nem exceder 100 palavras. Uma versão em língua inglesa correspondente deve ser fornecida no caso de artigos submetidos em português ou espanhol.

Descritores e Keywords

Devem ser fornecidos de três a seis termos em português/espanhol e inglês, que definam o assunto do trabalho, de acordo com os termos dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), publicados pelo Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME), disponíveis em <http://decs.bvs.br>, e dos Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis na homepage <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

Corpo do texto

Com exceção das unidades de medidas, siglas e abreviaturas devem ser evitadas ao máximo, devendo ser utilizadas apenas para termos consagrados. Estes termos estão definidos na Lista de Abreviaturas e Acrônimos aceitos sem definição. Clique aqui (Lista de Abreviaturas e Siglas). Quanto a outras abreviaturas, o termo deve aparecer ao menos três vezes para que possa ser abreviado e sempre definido na primeira vez em que for citado - por exemplo, proteína C reativa (PCR). Após a definição da abreviatura, o termo completo não deverá ser mais utilizado. Termos com palavras únicas não devem ser abreviados - por exemplo, tuberculose (TB). Com exceção das abreviaturas aceitas sem definição, elas não devem ser utilizadas nos títulos e evitadas no resumo dos manuscritos se possível. Para fazer referências ao longo do texto igualmente deve-se evitar a menção ao nome de autores, dando-se sempre preferência às citações numéricas apenas.

Quando os autores mencionarem qualquer substância ou equipamento incomum, deverão incluir o modelo/número do catálogo, o nome da fabricante, a cidade e o país, por exemplo: "... esteira ergométrica (modelo ESD-01; FUNBEC, São Paulo, Brasil)" No caso de produtos provenientes dos EUA e Canadá, o nome do estado ou província também deverá ser citado; por exemplo: "... tTG de fígado de porco da Guiné (T5398; Sigma, St. Louis, MO, EUA)"

Tabelas, Quadros e Figuras (Ilustrações)

Tabelas, quadros e figuras devem ser apresentados em preto e branco. As ilustrações devem ser enviadas no seu arquivo digital original; tabelas e quadros em arquivos Microsoft Word e figuras em arquivos JPEG com resolução mínima de 300 dpi. Fotografias de exames, procedimentos cirúrgicos e biópsias nas quais foram utilizadas colorações e técnicas especiais serão consideradas para impressão colorida, sem custo adicional aos autores. As grandezas,

unidades e símbolos devem obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT: <http://www.abnt.org.br>). As tabelas e figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos, de acordo com a ordem de citação no texto.

Legendas

Legendas deverão acompanhar todas as ilustrações. No caso de figuras (gráficos, fotografias, etc.), as legendas devem ser citadas logo abaixo da imagem e submetidas em arquivo Word. No caso de tabelas e quadros, as legendas devem estar no topo. Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a suas citações no texto. Notas de rodapé devem ser incluídas da seguinte maneira: primeiramente, todas as abreviaturas e siglas definidas por extenso; detalhes e informações extras a respeito da ilustração com letras em sobrescrito - p.ex., aValores expressos em n (%) -; e sinais tipográficos em sobrescrito (exceto *) para estatística - p.ex., *p < 0,05. Eis a sequência de uso desses sinais: *, +, ++, ¶, §, || e #.

Referências

Devem ser indicadas apenas as referências utilizadas no texto, numeradas com algarismos arábicos e na ordem em que foram citadas. Deve-se evitar a utilização dos nomes dos autores ao longo do manuscrito para referenciar partes do texto - utilize, ao invés, "um estudo" ou "um autor/um grupo de autores", por exemplo. A apresentação deve estar baseada no formato **Vancouver Style**, conforme os exemplos abaixo. Os títulos dos periódicos citados devem ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela **List of Journals Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine** disponibilizada no seguinte endereço: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog?term=currentyindexed%5BAII%5D>. Para todas as referências, cite todos os autores até seis. Acima desse número, cite os seis primeiros autores seguidos da expressão et al.

3 ARTIGO ORIGINAL

INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL (HGE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA PROLE SUBMETIDA A UM MODELO DE ASMA ALÉRGICA

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL GESTATIONAL HYPOTHYROIDISM (HGE) ON THE INFLAMMATORY RESPONSE OF THE OFFSPRING SUBMITTED TO AN ALLERGIC ASTHMA MODEL

Marina Inês de Oliveira Prado¹, Daniel Badauê-Passos Junior¹, Patricia Rabelo dos Santos¹

1 Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE, Brasil

Órgãos financiadores da pesquisa: CAPES e CNPq

Local onde o estudo foi realizado: Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE, Brasil.

Correspondência para:

Marina Inês de Oliveira Prado

Avenida Escritor Graciliano Ramos, número 100 – apartamento 502 bloco 2

Bairro Jabotiana – Aracaju/Sergipe, Brasil

CEP: 49095-650

(37) 99941-5924

RESUMO

Objetivos: Investigar a influência do hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) na resposta inflamatória da prole submetida à asma alérgica. **Métodos:** O hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) foi induzido em camundongos Swiss prenhas pela administração de Metimazol 0,02% na água de beber, do 9º dia gestacional até o dia do parto. Para verificar a influência do HGE na inflamação pulmonar, proles de mães hipotireoideanas (PMH) e eutireoideanas (PME) foram submetidas a um modelo animal de asma alérgica induzida por ovoalbumina (AAIO). Os dados obtidos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). As análises foram feitas utilizando a ANOVA two-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. O nível crítico fixado foi de 5%. **Resultados:** A prole de mãe hipotireoideana sensibilizada com ovalbumina (PMH-OVA) apresentou menor número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) ($p < 0,001$); houve, também, menor atividade da mieloperoxidase (MPO) no pulmão ($p < 0,001$) e menor conteúdo de peroxidase eosinofílica (EPO) no LBA ($p < 0,05$), comparados à prole de mãe eutireoideana sensibilizada com ovoalbumina (PME-OVA). **Conclusão:** Conclui-se que o HGE teve efeito inibitório sobre o recrutamento de leucócitos totais para o lavado broncoalveolar (LBA), atividade da MPO no pulmão e conteúdo de peroxidase eosinofílica no LBA da prole submetida ao modelo de asma alérgica induzida por ovoalbumina.

Palavras-chave: programação fetal; hipotireoidismo gestacional; asma; inflamação.

ABSTRACT

Objectives: Investigate the influence of experimental gestacional hypothyroidism (EGH) on the inflammatory response of offspring submitted to allergic asthma. **Methods:** The EHG was induced in pregnant Swiss mice by the administration of 0.02% Methimazole in drinking water from the 9th day of gestation up to delivery. In order to verify the influence of EGH on pulmonary inflammation, offspring of hypothyroid (OHM) and euthyroid (OEM) mothers were submitted to an animal model of ovalbumin-induced allergic asthma (OIAA). The data obtained were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Analyzes were performed using two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test. The critical level set was 5%. **Results:** The offspring of ovalbumin-sensitized hypothyroid mother (OHM-OVA) had lower total number of cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) ($p < 0.001$); There was

also lower lung myeloperoxidase (MPO) activity ($p < 0.001$) and lower eosinophilic peroxidase (EPO) content in BAL ($p < 0.05$) compared to egg-albumin-sensitized euthyroid mother offspring (OEM-OVA). **Conclusion:** EGH had an inhibitory effect on total leukocyte recruitment for bronchoalveolar lavage (BAL), lung MPO activity and eosinophil peroxidase content in BAL of the offspring submitted to the ovalbumin-induced allergic asthma model.

Keywords: gestational hypothyroidism; fetal programming; asthma; inflammation.

1 INTRODUÇÃO

Durante a vida intrauterina, o feto necessita de condições adequadas para o seu correto desenvolvimento. Se ocorrer algum estímulo diferente, surgem adaptações fisiológicas e metabólicas que podem repercutir de maneira negativa na vida pós-natal deste indivíduo. Esse conceito é conhecido como programação fetal e surgiu a partir da Teoria de Barker (1,2).

O feto depende dos hormônios tireoidianos (HT) da mãe para se desenvolver corretamente, pois o seu eixo hipotálamo-hipófise-tireoide permanece imaturo até a 38ª semana de gestação. Assim, as gestantes devem manter os níveis de T4 entre 30% e 100% maiores para conseguirem suprir adequadamente o feto (3). No entanto, esse aumento fisiológico pode não ocorrer em grávidas que possuem disfunção tireoideana (4).

O hipotireoidismo gestacional é definido pelo aumento do hormônio tireoestimulante (TSH) junto com a diminuição de T4 livre. Os valores do TSH de até 2,5 mU/L no primeiro trimestre e de até 3,5 mU/L nos outros dois trimestres devem ser considerados normais na gestação, porém, outras referências consideram o valor de até 3,0 mU/L nos dois últimos trimestres (4,5).

A triagem universal para patologias tireoidianas na gravidez não é recomendada pela *American Thyroid Association* (4), embora muitos defendam que o rastreamento seletivo deixa de diagnosticar disfunções tireoidianas em uma parcela significativa de gestantes (6). Assim, se a mulher possuir hipotireoidismo gestacional, a prole poderá apresentar alterações orgânicas nos sistemas na vida adulta. Por exemplo, esses hormônios são essenciais para a migração neuronal, a mielinização e outras alterações estruturais do cérebro fetal. Dessa forma, indivíduos filhos de mães hipotireoidianas podem apresentar comprometimento intelectual (4).

Em relação ao sistema imune, pesquisas já mostram que proles de mães com hipotireoidismo gestacional, apresentam alteração na resposta imunológica na vida adulta. Estudo recente evidenciou que a deficiência de hormônio tireoideano materno durante a gestação aumenta a susceptibilidade da prole em desenvolver doenças inflamatórias no

sistema nervoso central (SNC), sendo que, a prole de mães com hipotireoidismo desenvolveu encefalomielite aguda experimental de uma forma mais severa (7).

Outro estudo mostrou que camundongos fêmeas gestados em hipotireoidismo tem maior taxa de sobrevivência e menor disseminação bacteriana após um desafio com *Streptococcus pneumoniae*, o que sugere que o hipotireoidismo gestacional aumenta a resistência da prole às infecções bacterianas respiratórias (8).

A asma é um distúrbio imunológico, com componentes genéticos e ambientais, que afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo. Estudos atuais sugerem que a exposição aos estímulos ambientais específicos durante determinados períodos da vida influencia o desenvolvimento da asma. Um desses períodos críticos é a vida intrauterina (9).

Portanto, sabendo da influência dos hormônios tireoideanos (HTs) no desenvolvimento do sistema imunológico, a proposta desse estudo é avaliar a influência do hipotireoidismo materno, exclusivamente durante o período gestacional, em parâmetros inflamatórios da prole submetida a um modelo de asma alérgica na vida pós-natal.

2 OBJETIVO

Investigar a influência do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) na resposta inflamatória pulmonar da prole submetida a um modelo de asma alérgica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados para a realização do experimento foram os camundongos heterogêneos da linhagem Swiss. Todos os animais adquiridos do Biotério Setorial foram colocados para acasalar e a prole resultante foi utilizada nos experimentos quando completou 60 dias Pós-Natal (DPN).

Os procedimentos realizados estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA, 2016), bem como pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia (2018), ambas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido para análise do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe, sendo aprovado sob o protocolo nº 53/2017 (ANEXO).

3.2 Acasalamento programado

As fêmeas foram submetidas à análise colpocitológica e quando foi identificada uma fêmea na fase Proestro, esta foi colocada na presença de um macho e estes foram mantidos em uma mesma caixa durante a noite, quando supostamente ela estaria na fase Estro. Após nove dias, foi considerada prenha a fêmea que o peso aumentou no mínimo 4g em relação ao peso do dia do acasalamento. O dia gestacional zero foi considerado o dia seguinte a composição dos casais.

3.3 Indução do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE)

Para a indução de HGE foi utilizado o Metimazol (MTZ), uma droga do grupo das tionamidas, que age inibindo a síntese dos hormônios tireoidianos (5). Essa droga foi ofertada na concentração de 0,02% na água dos animais, a partir do nono dia de gestação (DG) até o dia do parto, o que gerou hipotireoidismo nos camundongos prenhas.

3.4 Asma alérgica induzida por ovoalbumina (AAIO)

3.4.1 Modelo de Inflamação Pulmonar

Utilizamos um modelo animal, adaptado de outros estudos (10,11), com duração de 24 dias, que usa a ovoalbumina como sensibilizadora alérgena.

Aos 60 dias pós-natal (DPN), as proles de mães eutireoideanas (PME) e hipotireoideanas (PMH), foram submetidas à sensibilização através de três injeções peritoneais (i.p.) de solução sensibilizadora em intervalos de sete dias, após o qual foram realizados três desafios por via intranasal (no caso, nos dias experimentais 21, 22 e 23). A solução utilizada na etapa de sensibilização foi composta por 100 µg de ovoalbumina (OVA Grade III; Sigma – Aldrich) adsorvida em 20mg de hidróxido de alumínio (AlOH₃), solubilizados em 100 µl de salina estéril (NaCl 0,9%), para cada animal. O primeiro dia de administração foi considerado o dia 0 da indução.

Já na etapa do desafio as proles foram desafiadas com solução composta somente por 100 µg de OVA em 25 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), por via intranasal. O grupo controle negativo (salina) foi sensibilizado com 100 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), por via intraperitoneal, contendo apenas 20 mg de hidróxido de alumínio, e desafiado apenas com 25uL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), por via intranasal.

Quadro 1 Relação dos grupos experimentais do protocolo de asma alérgica induzida por ovoalbumina (OVA) - AAIO

Grupos	Tratamentos	Abreviações	N
1	Proles de mães eutireoideanas sensibilizadas e desafiadas com salina.	PME + Salina	4 – 9
2	Proles de mães eutireoideanas sensibilizadas e desafiadas com OVA.	PME + OVA	4 – 9
3	Proles de mães hipotireoideanas sensibilizadas e desafiadas com salina.	PMH + Salina	4 – 6
4	Proles de mães hipotireoideanas sensibilizadas e desafiadas com OVA.	PMH + OVA	5 – 8

3.4.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

3.4.2.1 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), preparo e quantificação celular

Após 24 horas do último desafio, as proles foram anestesiadas. Para coletar o lavado broncoalveolar (LBA) foi realizada uma traqueostomia nos animais e uma cânula vinculada a uma seringa de 1ml foi inserida na traqueia através do orifício formado. Em seguida foram realizadas cinco infiltrações intratraqueais de 300 μ L de PBS (10 mM, pH 7,4) – BSA 3%, totalizando um volume de 1500 μ L que foi lentamente injetado. O fluído do lavado recuperado (em média 1200 μ L) foi mantido em gelo até o final da coleta e, depois, centrifugado por 10 min a 1500 rpm e 4°C. O sobrenadante do fluido centrifugado foi coletado e armazenado em freezer a -80°C, para ser dosado posteriormente, e o pellet de células foi ressuspensão em 200 μ L PBS (10 mM, pH 7,4) – BSA 3%.

Um volume de 10 μ L da solução contendo o pellet ressuspensão foi acrescentado a 190 μ L de líquido de Turk e a solução final foi usada para contagem do número total de células em câmara Neubauer com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. Os resultados foram expressos como número de células por LBA.

3.4.2.2 Ensaio da Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Para quantificar o acúmulo de neutrófilos no pulmão, foi usado o ensaio da mieloperoxidase (MPO), que já foi descrito por outros estudos (12,13). A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. A MPO degrada o peróxido de hidrogênio, produzindo ânion superóxido, responsável por converter o substrato o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação de densidade óptica em função do tempo de reação foi detectada na absorvância medida a 460 nm.

Os animais foram anestesiados e perfundidos com 50 ml de tampão PBS-HEPARINA (0,1%). Em seguida, os pulmões foram coletados, cortados em pequenos pedaços e homogeneizados em tampão fosfato (50mM, pH 6,0) com 0,5% de de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Em seguida, alíquotas de 1mL do homogenato foram

centrifugadas (2 min a 14000 rpm, 4°C), para obtenção dos sobrenadantes. Em uma placa contendo 96 poços, 10uL dos sobrenadantes obtidos foram pipetados, aos quais foram adicionados 200 uL de uma solução contendo solução de dihidroclorato de o-dianisidina. As alterações nos valores das absorbâncias detectadas a 460 nm foram registradas com leitor microplaca com intervalos de 15 segundos por 5-10 min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO por mg de tecido (mUMPO/mg de tecido). Uma UMPO foi considerada como a quantidade de enzima que degrada 1 umol de O₂/min.

3.4.2.3 Ensaio da Determinação da Peroxidase Eosinofílica (EPO) no LBA

A peroxidase dos eosinófilos (EPO) foi estabelecida no lavado broncoalveolar (LBA), considerando o método específico para essa enzima, que já foi relatado por outro estudo (14).

Utilizou-se uma microplaca com 96 poços onde foi colocado 100 uL da solução de substrato contendo o-fenilenodiamina dihidroclorato – OPD (0.1mM) – e Triton X-100 (0,1%), na presença de H₂O₂ (1 mM) solubilizados em Tris - HCl (0,05 M, pH 8), a 50 uL de amostra do sobrenadante do lavado broncoalveolar. A reação foi incubada por 30 min na temperatura de 37° graus e interrompida com a adição de 50 uL de ácido sulfúrico [4 M]. A densidade óptica da reação foi lida a 492 nm.

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos em valores de média e erro padrão da média (EPM). Foi utilizado ANOVA *two-way*, seguida do pós-teste de Bonferroni, para comparação entre mais de dois grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação. O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Acompanhamento da massa corpórea das fêmeas prenhas e massa corpórea da prole

Comparando a massa corpórea das mães eutireoideanas (ME) e hipotireoideanas (MH), aos 0 e 9º dias gestacionais (DG) e no dia do parto (DP) (Figura 1), a análise de variância de duas vias (ANOVA two way) mostrou que o peso das fêmeas prenhas aumenta significativamente ao longo do tempo ($p < 0,0001$). Da mesma forma, observa-se que o tratamento gestacional não tem influência significativa sobre essa variável ($p = 0,95$). Ou seja, o peso dos animais analisados torna-se maior no decorrer da gestação independente do tratamento gestacional ($p=0,19$).

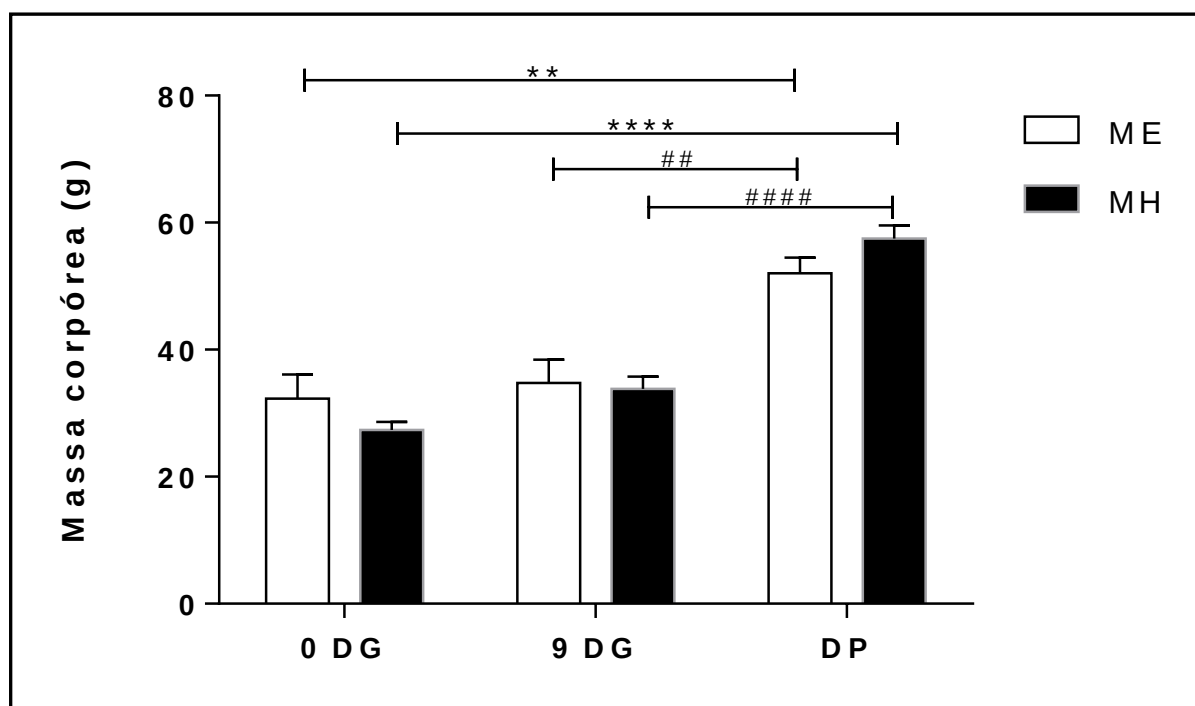


Figura 1: ME: mães eutireoidianas; MH: mães hipotireoidianas; DG: dia gestacional; DP: dia do parto. Influência do HGE na massa corpórea de fêmeas prenhas, após a cópula (0 DG), nove dias após a cópula (9 DG) e no dia do parto (DP).

Em relação ao peso das proles de mães eutireoideanas (PME) e hipotireoideanas (PMH) após o nascimento, aos sete dias pós-natal (DPN) e 14 DPN, figura 2A e 2B, respectivamente, machos PMH apresentaram massa corporal diminuída em comparação aos machos PME, com valores do *Teste T student* não pareado para os dados do 7 DPN: ($p=0,0057$) e 14 DPN: ($p=0,0264$). Com 21 DPN (Fig. 2C), 30 DPN (Fig. 2D) e 60 DPN (Fig.

2E) essa diferença não ocorreu, com valores do Teste T student não pareado para os dados do 21 DPN ($p=0,3463$), 30 DPN: ($p=0,7096$) e 60 DPN: ($p=0,9433$).

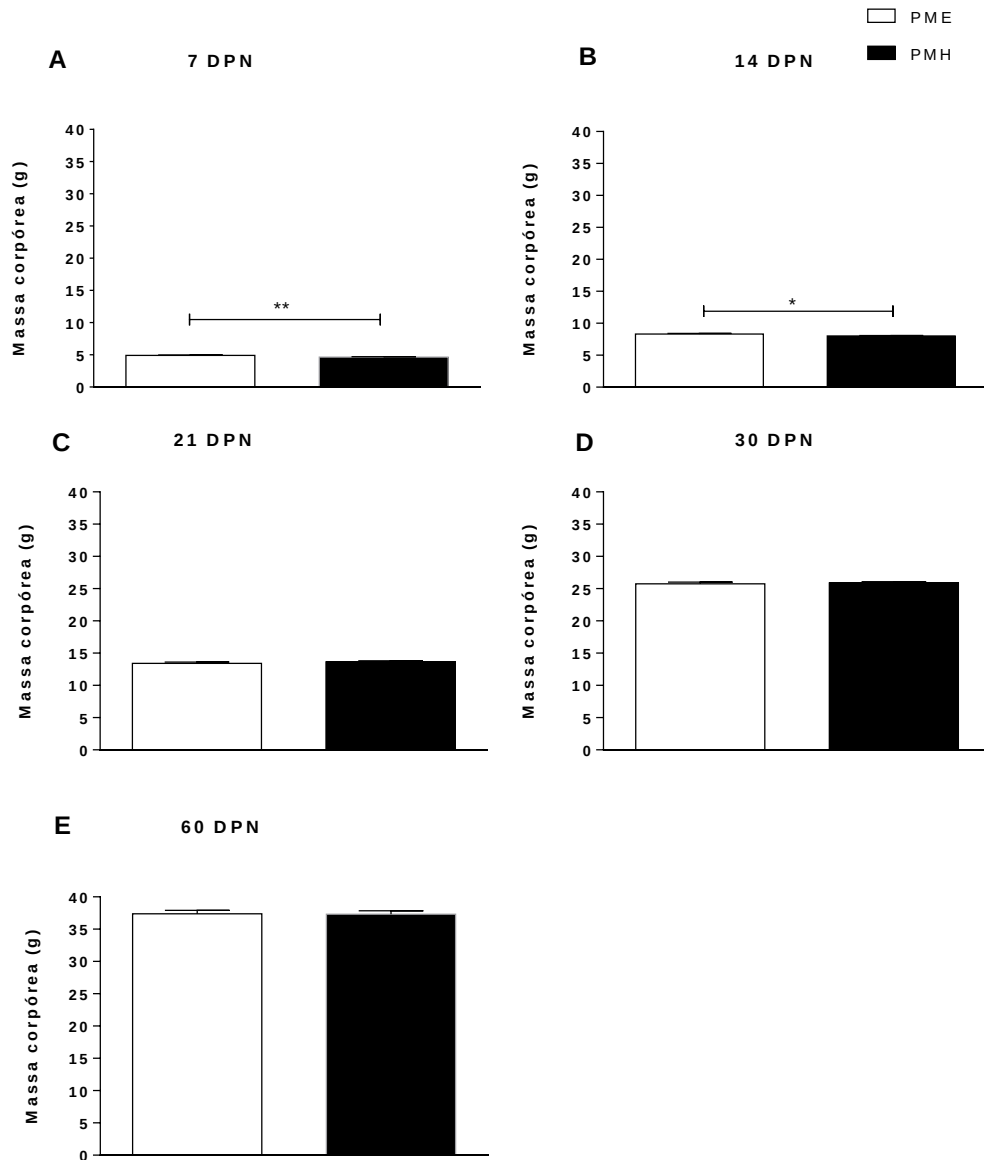


Figura 2: PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas; DPN: dia pós natal. Efeito do HGE sobre a massa corpórea da PME e PMH aos 7 DPN (Painel A), 14 DPN (Painel B), 21 DPN (Painel C), 30 DPN (Painel D) e 60 DPN (Painel E).

4.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios na prole submetida a um modelo de asma alérgica

Para analisar a influência do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre o infiltrado inflamatório do lavado broncoalveolar (LBA) das proles, foi utilizada a técnica estatística de análise de variância de duas vias (ANOVA two way), que demonstrou interação dos fatores de variação ‘tratamento gestacional’ (TG) e ‘indução da asma’ (IA) sobre o número total de células do LBA ($p = 0,0016$). Isoladamente, esses fatores de variação também foram significativos (TG: $p = 0,0006$; IA: $p < 0,0001$). Quando analisado, o pós-teste de Bonferroni mostrou que o infiltrado de células inflamatórias no LBA da prole de mães eutireoideanas que foram induzidas a asma alérgica (PME – OVA) é significativamente maior quando comparado ao seu controle experimental (PME-Salina) ($p < 0,0001$). O mesmo padrão foi visto entre o LBA das proles de mãe hipotireoideanas sensibilizadas com ovalbumina (PMH-OVA), em comparação com o seu grupo controle experimental (PMH-Salina). Além disso, o número total de leucócitos no LBA da PMH – OVA foi significativamente menor que o número total de leucócitos no BAL da PME – OVA ($p < 0,0001$) (Figura 3).

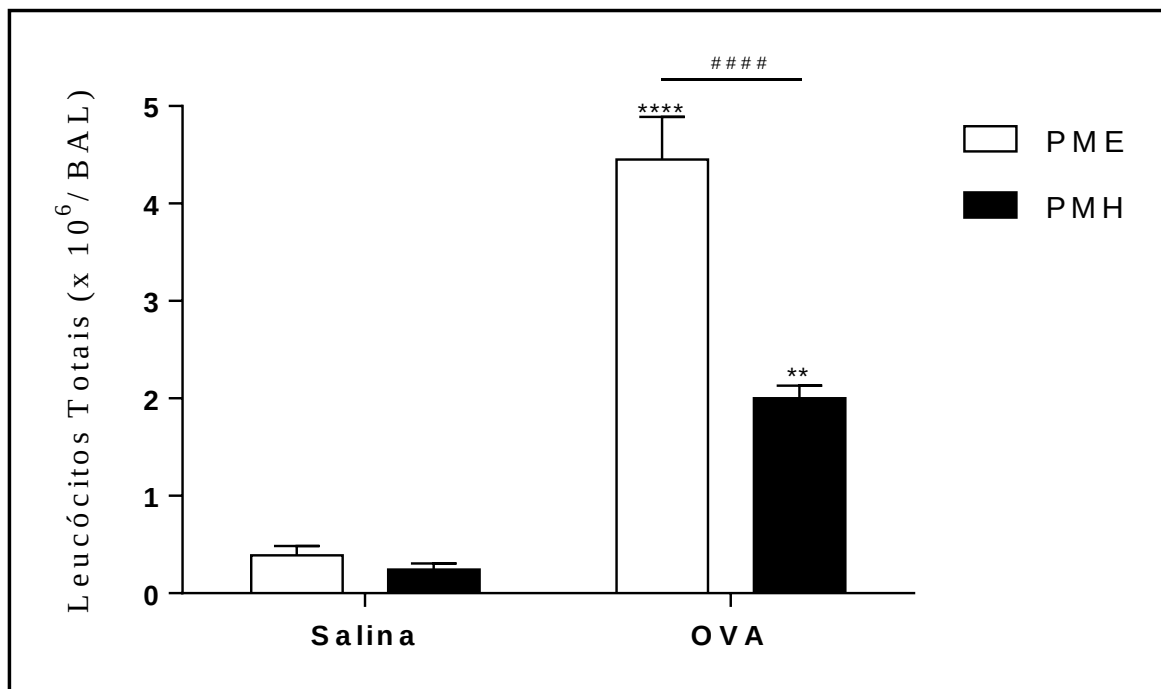


Figura 3: PME: prole de mães eutireoideanas; PMH: prole de mães hipotireoideanas; Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre o número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.

Em relação à atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar, a análise de variância de duas vias (ANOVA *two way*) também mostrou interação significativa do fator de variação ‘tratamento gestacional’ e ‘indução da asma’ ($p < 0,0001$), além de efeito isolado dos mesmos ($p < 0,0001$, para os dois fatores) em relação à atividade MPO. A análise do pós-teste demonstrou que a atividade da MPO da PME-OVA foi significativamente maior que da PME-salina ($p < 0,0001$) e o mesmo ocorreu entre a atividade da MPO da PMH-OVA e a PMH-salina ($p < 0,05$). Outra diferença observada foi a atividade da MPO da PMH-OVA significativamente menor em relação a do grupo PME-OVA ($p < 0,0001$). Conforme esperado, não houve diferença estatística significativa entre a atividade da MPO entre a PME-salina e PMH-salina ($p = \text{n.s.}$) (Figura 4).

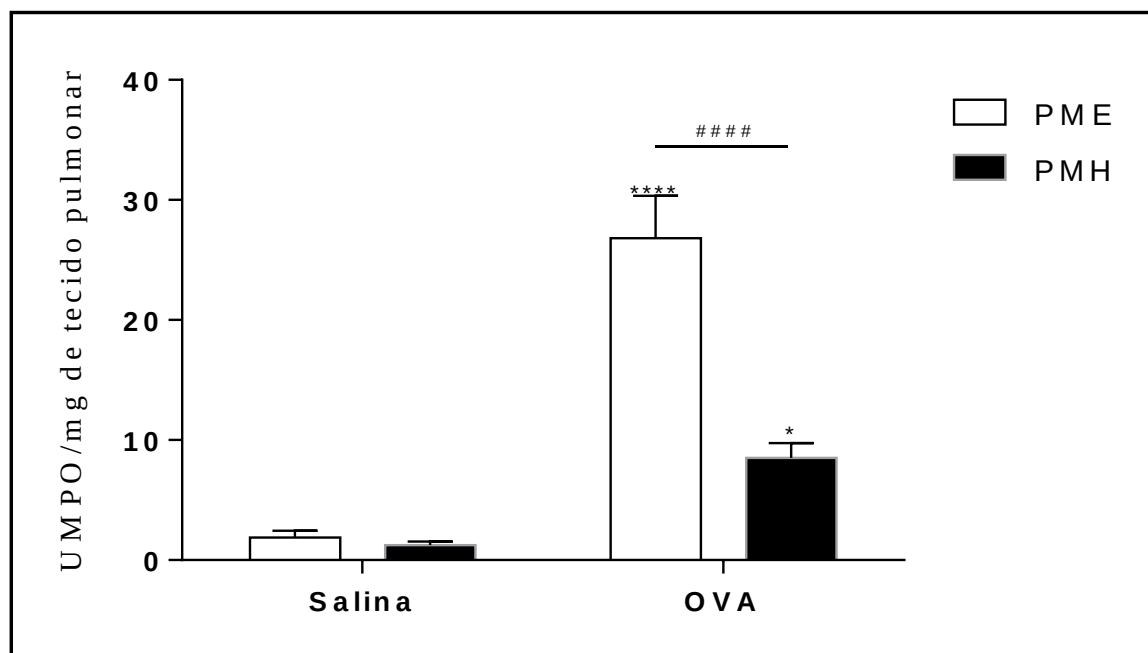


Figura 4: PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas. Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.

Para quantificar os eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar (BAL) foi estimado o conteúdo de peroxidase eosinofílica (EPO) nas amostras de BAL. Usando o método estatístico ANOVA *two way*, mostrou-se que os fatores de variação ‘tratamento gestacional’ (TG) e ‘indução da asma’ (IA) possuem influência significativa sobre o conteúdo de peroxidase eosinofílica quando tem seus efeitos avaliados isoladamente (TG: $p = 0,038$; IA: $p = 0,020$) e também quando se avaliou a possibilidade de interação desses fatores sobre a

EPO ($p = 0.045$). Com a análise do pós-teste, observou-se que ao mesmo tempo em que a PME-OVA possuiu maior conteúdo de EPO do que a PME-salina ($p < 0,001$), não foi observado diferença significativa no conteúdo de EPO entre a PMH-OVA e PMH-salina ($p = \text{n.s.}$). Ademais, a PMH-OVA possui menor atividade da EPO do que o grupo PME-OVA ($p < 0,05$) (Figura 5).

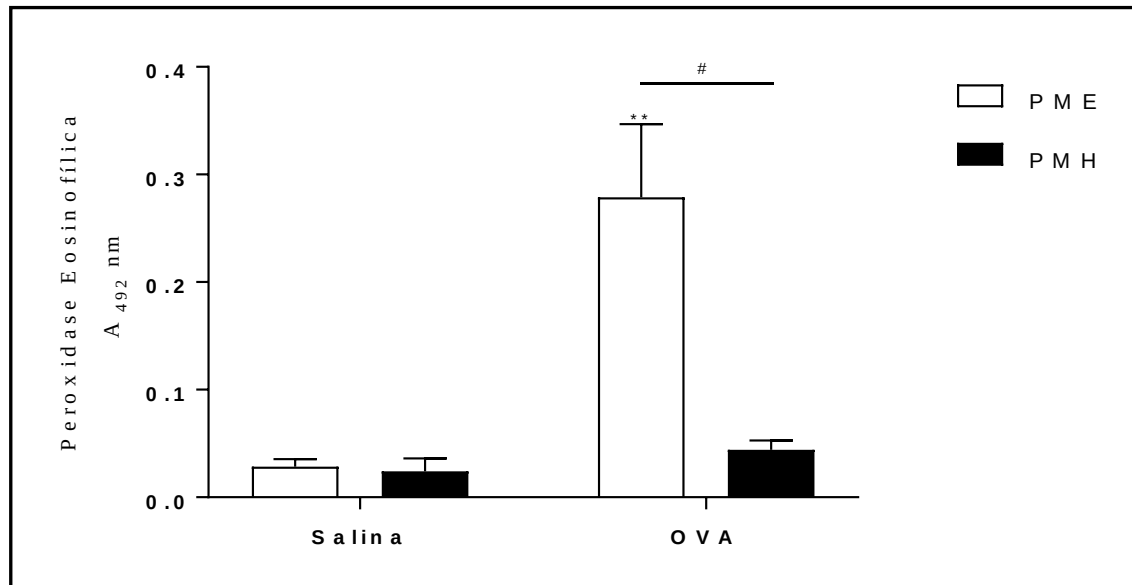


Figura 5: PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas; OVA: ovoalbumina. Efeito do Hipotireoidismo Gestacional Experimental (HGE) sobre a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado broncoalveolar (BAL) da prole de camundongos submetida um modelo de asma alérgica.

5 DISCUSSÃO

O modelo de indução do hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) utilizado neste estudo é um protocolo já aplicado em diversos experimentos. Estes mostraram que a administração de metimazol (MTZ) 0,02% na água de beber nas fêmeas prenhas, do 9º dia de gestação até o dia do nascimento da prole, diminui a concentração dos hormônios T4 e T3 no final da gestação, além de aumentar a de hormônio tireoestimulante (TSH) (8,15). Já em relação à prole, estudos prévios analisaram os níveis de T4, T3 e TSH e mostram que todas as proles eram eutireoidianas na idade adulta, tanto utilizando o MTZ (7) quanto o PTU (16).

Além disso, o HGE alterou a massa corporal das proles nos dias 7 e 14 dias pós-natal (DPN), sendo que as PMH tiveram menor massa corpórea em relação à PME. Esse achado está de acordo com o estudo de MELANCIA et al., 2017 que também utilizou MTZ 0,02% na água de beber das mães até o dia do parto e mostrou que a prole nascida de mães expostas ao HGE apresentou um peso corporal reduzido em comparação com os proles nascidas do grupo controle nos dias 5, 9, 13 e 30 DPN.

O primeiro estudo a associar o hipotireoidismo materno ao desenvolvimento de asma em crianças foi um estudo de coorte na Dinamarca entre 1998 e 2007 que mostrou que os filhos de mães hipotireoidianas apresentavam maior risco de desenvolver asma na infância. Uma das explicações para essa conclusão se baseia na hipótese de que hormônios tireoidianos insuficientes no período intrauterino podem resultar em pulmões com estrutura anormal e menos septos alveolares, o que predispõe a criança a desenvolver asma. No entanto, este é um estudo epidemiológico, que apresenta algumas limitações, por exemplo, a identificação de hipotireoidismo materno e de asma infantil foi feita a partir de registros de hospitais, assim, os erros de classificação não podem ser descartados (17).

Os nossos achados não concordam com o estudo de Liu et al. (2018), que foi realizado em humanos. O objetivo do nosso trabalho foi analisar em camundongos a influência do hipotireoidismo gestacional, exclusivamente durante a gestação, sobre o risco da prole de desenvolver asma alérgica. Assim, analisou-se a resposta inflamatória das proles de mães hipotireoidianas e eutireoidianas que foram sensibilizadas com Ovoalbumina (OVA) e verificou-se que o hipotireoidismo materno diminui a inflamação pulmonar da prole.

Em relação modelo de asma alérgica induzido por Ovoalbumina, os nossos resultados são semelhantes aos encontrados na literatura. Determinado estudo avaliou os efeitos da obesidade na inflamação alérgica eosinofílica em camundongos e mostrou que a provocação com ovalbumina nos camundongos sensibilizados causou um aumento significativo no número de células inflamatórias totais e de eosinófilos (19).

Nossos resultados também mostram que não houve diferença do conteúdo da peroxidase eosinofílica (EPO) entre PMH-OVA e PMH-salina, sugerindo que a resposta inflamatória alérgica da prole de mãe hipotireoidiana teve fenótipo principalmente neutrofílico, não havendo recrutamento de eosinófilos, devido ao efeito do hipotireoidismo materno, exclusivamente durante a gestação, na resposta imunológica fetal.

Apesar dos poucos estudos sobre o assunto, já se sabe que a falta de hormônios tireoidianos maternos afeta o sistema imune da prole. Um experimento mostrou que proles machos expostas, através do leite materno, ao Propiltiouracil (PTU) 0,02% oferecido às mães em água potável, apresentaram peso médio do baço e do timo menores nos dias 22 e 30 DPN, aumento da proporção de células *natural killer* (NK) e diminuição da proporção de células B no baço aos 14, 22 e 30 DPN, além do aumento de células T aos 22 e 30 DPN, principalmente das células T CD4. Esse estudo pode justificar os nossos achados, pois a produção de anticorpos para a OVA depende das células B, que estão diminuídas de forma transitória devido ao hipotireoidismo materno e, assim, gera uma resposta inflamatória pulmonar diminuída (19).

Há poucos trabalhos na literatura que, assim como este, estudaram a influência do hipotireoidismo materno exclusivamente durante o desenvolvimento fetal na resposta imune durante a vida pós-natal. Nieto et al., (2016), já citado anteriormente, foi o primeiro experimento a relatar que o hipotireoidismo gestacional imprime à prole feminina maior resistência à morte após uma infecção por *Streptococcus pneumoniae*, sugerindo que apresentam uma alteração no recrutamento de células inflamatórias inatas para os pulmões após a infecção por essa bactéria e uma expressão diferencial de citocinas no pulmões em 48h após a infecção. Este estudo encontrou alteração apenas em fêmeas, sugerindo que a deficiência de hormônios tireoidianos durante a gravidez pode ter afetado os níveis de hormônios sexuais femininos da prole. Assim, o nosso trabalho é o primeiro da literatura a mostrar a influência do hipotireoidismo materno sobre a resposta imune de machos da linhagem Swiss PMH.

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o Hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) teve efeito inibitório sobre o recrutamento de leucócitos totais para o lavado broncoalveolar, atividade da mieloperoxidase no pulmão e conteúdo de peroxidase eosinofílica no LBA da prole submetida ao modelo de asma alérgica.

REFERÊNCIAS

1. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci*. 16 de agosto de 2011;108(33):E513–8.
2. Kwon EJ, Kim YJ. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci*. novembro de 2017;60(6):506–19.
3. Opazo MC, Haensgen H, Bohmwald K, Venegas LF, Boudin H, Elorza AA, et al. Imprinting of maternal thyroid hormones in the offspring. *Int Rev Immunol*. 4 de julho de 2017;36(4):240–55.
4. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid*. 6 de janeiro de 2017;27(3):315–89.
5. Sgarbi JA, Teixeira PFS, Maciel LMZ, Mazeto GMFS, Vaisman M, Montenegro Junior RM, et al. Consenso brasileiro para a abordagem clínica e tratamento do hipotireoidismo subclínico em adultos: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol*. abril de 2013;57(3):166–83.
6. Pop VJ, Broeren MA, Wiersinga WM, Stagnaro-Green A. Thyroid disease symptoms during early pregnancy do not identify women with thyroid hypofunction that should be treated. *Clin Endocrinol (Oxf)*. dezembro de 2017;87(6):838–43.
7. Albornoz EA, Carreño LJ, Cortes CM, Gonzalez PA, Cisternas PA, Cautivo KM, et al. Gestational hypothyroidism increases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in adult offspring. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc*. dezembro de 2013;23(12):1627–37.
8. Nieto PA, Peñaloza HF, Salazar-Echegarai FJ, Castellanos RM, Opazo MC, Venegas L, et al. Gestational Hypothyroidism Improves the Ability of the Female Offspring to Clear *Streptococcus pneumoniae* Infection and to Recover From Pneumococcal Pneumonia. *Endocrinology*. 1º de junho de 2016;157(6):2217–28.
9. Richgels PK, Yamani A, Chougnet CA, Lewkowich IP. Maternal house dust mite exposure during pregnancy enhances severity of HDM-induced asthma in murine offspring. *J Allergy Clin Immunol*. novembro de 2017;140(5):1404–1415.e9.
10. Ci X, Chu X, Wei M, Yang X, Cai Q, Deng X. Different effects of farrerol on an OVA-induced allergic asthma and LPS-induced acute lung injury. *PloS One*. 2012;7(4):e34634.
11. Park S, Baek H, Jung K-H, Lee G, Lee H, Kang G-H, et al. Bee venom phospholipase A2 suppresses allergic airway inflammation in an ovalbumin-induced asthma model

- through the induction of regulatory T cells. *Immun Inflamm Dis.* dezembro de 2015;3(4):386–97.
12. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* março de 1982;78(3):206–9.
 13. Camargo EA, Ferreira T, Ribela MTCP, de Nucci G, Landucci ECT, Antunes E. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2. *Pancreas.* julho de 2008;37(1):50–5.
 14. Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods.* 7 de novembro de 1985;83(2):209–15.
 15. Melancia F, Servadio M, Schiavi S, Campolongo P, Giusti-Paiva A, Trezza V. Testing the correlation between experimentally-induced hypothyroidism during pregnancy and autistic-like symptoms in the rat offspring. *Behav Brain Res.* 15 de 2017;321:113–22.
 16. Amano I, Takatsuru Y, Khairinisa MA, Kokubo M, Haijima A, Koibuchi N. Effects of Mild Perinatal Hypothyroidism on Cognitive Function of Adult Male Offspring | *Endocrinology | Oxford Academic.* Endocrinology. abril de 2018;159(4):1910–21.
 17. Liu X, Andersen SL, Olsen J, Agerbo E, Schlünssen V, Dharmage SC, et al. Maternal hypothyroidism in the perinatal period and childhood asthma in the offspring. *Allergy.* 2018;73(4):932–9.
 18. Calixto MC, Lintomen L, Schenka A, Saad MJ, Zanesco A, Antunes E. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol.* 1º de fevereiro de 2010;159(3):617–25.
 19. Rooney AA, Fournier M, Bernier J, Cyr DG. Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus. *Cell Immunol.* junho de 2003;223(2):91–102.

ANEXO

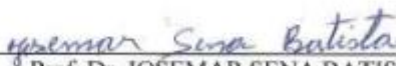


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da influência do hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) na resposta inflamatória da prole de camundongos submetidos a um modelo de asma alérgica", registrada com o nº 53/2017, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 23/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 06/2018, Término: 06/2019
Espécie/linhagem/raca	Camundongo heterogênico
Nº de animais	340
Peso/Idade	25-30g / 03 dias
Sexo	270 M + 70 F
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.


 Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS