



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DANIELLE PEREIRA GAUJAC**

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL  
EXPERIMENTAL NO COMPORTAMENTO INGESTIVO E  
PERFIL METABÓLICO DA PROLE DE RATAS**

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2013**

**DANIELLE PEREIRA GAUJAC**

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO  
GESTACIONAL EXPERIMENTAL NO  
COMPORTAMENTO INGESTIVO E PERFIL  
METABÓLICO DA PROLE DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Luciana Catunda Brito

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2013**

## Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

Gaujac, Danielle Pereira

G268i      Influência do hipotireoidismo gestacional experimental no comportamento ingestivo e perfil metabólico da prole de ratas / Danielle Pereira Gaujac ; orientador Daniel Badauê Passos Junior. – São Cristóvão, 2013.

81 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Hipotireoidismo congênito. 2. Ingestão alimentar . 3. Marcadores bioquímicos. 4. Ratos. 5. Diferenciação do sexo. 4. Ingestão de líquidos – Comportamento. I. Passos Junior, Daniel Badauê, orient. II. Título.

CDU: 616.441-008.6

**DANIELLE PEREIRA GAUJAC**

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO  
GESTACIONAL EXPERIMENTAL NO  
COMPORTAMENTO INGESTIVO E PERFIL  
METABÓLICO DA PROLE DE RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Catunda Brito**

**Orientador Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior**

**1º Examinador: Prof. Dr. Luis Carlos Reis**

**2º Examinador: Profa. Dra. Liliane Viana Pires**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dário e Rejane, pela dedicação, carinho e apoio sempre! Pelo respeito às minhas decisões e por terem se abdicado da minha companhia para que eu pudesse batalhar por meus objetivos a curto e longo prazo. Agradeço por todo esforço que vocês fizeram por mim, esforço que se transformou na minha chegada até aqui! AMO VOCÊS!

Ao meu marido, Cristiano, pelo seu amor, que me fortalece e me faz crescer! Pelo incentivo incondicional ao meu mestrado e todas as escolhas que faço. Obrigada por estar ao meu lado sempre e por compartilhar mais um momento importante, de muitos outros que estão por vir. TE AMO!

Ao irmão, Danilo, pelo amor inigualável e pela torcida. A toda a minha família, avós, tios, primos, etc., por compreenderem minha ausência e por sempre me incentivarem!

Ao meu orientador, Daniel Badauê, exemplo de amor e dedicação à profissão. Obrigada por todo apoio, amizade, conhecimento e ensinamentos. Por acreditar em meu trabalho, mesmo nos momentos que até eu duvidei. Esses dois anos de mestrado foram muito valiosos para a minha formação científico-pessoal e isto jamais será perdido graças a sua efetiva participação.

A todos os amigos que integram o Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC). Aos pós-graduandos Iura, Cibelle, Patrícia, Edênia, Camila e Júlio por compartilharem tão de perto todas as frustrações e alegrias do mestrado! Aos alunos de iniciação científica Marília, Laís, Saulo, Demetrius e Tharciany pela ajuda com a manutenção do experimento. Obrigada a todos pela convivência, aprendizagem, amizade, compreensão, colaboração e diversão em todos os momentos que passamos juntos. Somos uma verdadeira família! Em especial, agradeço às amigas do LANBAC, Iura e Cibelle, a presença de vocês foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!!!

A todos os professores do programa, que não mediram esforços para a construção deste curso, e que participaram, positivamente, na minha formação científica durante estes dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida. À Universidade Federal de Sergipe pela estrutura disponibilizada e pela qualidade de ensino. Ao CNPq (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento Científico e Tecnológico) e a FAPTEC/SE (Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe) pelo apoio financeiro a este trabalho.

Aos animais utilizados neste trabalho, aos quais através de suas vidas proporcionaram novos conhecimentos à comunidade científica.

## RESUMO

INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL NA BIOLOGIA DO COMPORTAMENTO INGESTIVO E PERFIL METABÓLICO DA PROLE DE RATAS, Danielle Pereira Gaujac, São Cristóvão, 2013.

Recentes abordagens experimentais têm imputado valor aos eventos ocorridos durante a vida intrauterina como cruciais no aparecimento de doenças na vida pós-natal. Os hormônios tireoidianos (HTs) são críticos para fisiologia do metabolismo e desenvolvimento corporal. O objetivo do presente estudo foi investigar as repercussões da carência dos HTs em ratas prenhes na evolução ponderal da massa corporal, perfil bioquímico, comportamento ingestivo de ração, água e sódio (NaCl 0,3M) da prole em diferentes idades pós-natais. O hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) foi induzido através da adição de metimazol 0,02% na água de beber a partir do dia 9 de gestação até o parto. O grupo de prole (machos e fêmeas) de mães hipotireoideanas (PMH) foi comparado ao grupo controle de mães eutireoideanas (PME). Realizou-se o teste de tolerância à insulina (TTI) e o teste de tolerância à glicose (TTG). Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de duas ou três vias, quando necessário, seguidos do pós-teste de Bonferroni. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a PMH apresentou massa corporal menor aos 23 e 30 dias pós-natal (DPN) ( $p < 0,0001$ ). Padrão similar foi encontrado quando as proles foram separadas por gênero, aos 60, 90 e 120 DPN ( $p < 0,0001$ , para ambos os gêneros). No entanto, não houve diferença significativa na ingestão de ração entre os machos PMH e PME. As fêmeas da prole de mães hipotireoideanas (f-PMH) apresentaram menor capacidade de reduzir a glicemia no TTI ( $p = 0,0224$ ) sem alteração no TTG. Aos 60 DPN, a concentração sérica de glicose foi maior nas f-PMH ( $p = 0,013$ ) que nas f-PME. Nos machos prole de mães hipotireoideanas (m-PMH) o colesterol plasmático foi elevado aos 60 DPN e reduziu aos 120 DPN ( $p < 0,0001$ ), quando comparado aos machos prole de mães eutireoideanas (m-PME). Nas f-PMH o colesterol sérico foi menor somente aos 120 DPN ( $p = 0,035$ ). O HDL sérico foi menor na PMH aos 15 e 30 DPN ( $p = 0,04$ ), e continuou menor nas f-PMH aos 60, 90 e 120 DPN ( $p = 0,024$ ). Entretanto, o HGE elevou as concentrações séricas de TGL, bem como de VLDL, na PMH aos 15 DPN, e após a puberdade (aos 60 DPN), somente nos m-PMH ( $p < 0,0001$ ). A concentração sérica de ureia foi menor na PMH aos 15 e 30 DPN. Interessantemente, a ureia sérica foi invertida aos 60 DPN, se apresentando elevada tanto em m- ( $p = 0,006$ ) como em f-PMH ( $p = 0,003$ ), quando comparados aos respectivos grupos controle. Aos 120 DPN, a massa da gordura retroperitoneal foi menor tanto em m- ( $p = 0,05$ ) como em f-PMH ( $p = 0,009$ ). Adicionalmente, em todas idades estudadas, as massas relativas dos rins e do fígado foram menores tanto em m- ( $p = 0,001$ ) como em f- da PMH ( $p = 0,008$ ). Em conclusão, demonstrou-se, pela primeira vez, que os HTs maternos são críticos para o desenvolvimento ontogênico de sistemas que regulam o metabolismo de energia ao longo da vida da prole, resultando numa redução da massa corporal, instabilidade bioquímica ao longo da vida, menor sensibilidade à insulina em fêmeas, e um atraso no desenvolvimento de órgãos críticos para o metabolismo de macronutrientes.

**Palavras chave:** hipotireoidismo congênito; comportamento de ingestão de líquidos; ingestão alimentar; marcadores bioquímicos; ratos; diferenças sexuais

## ABSTRACT

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL GESTATIONAL HYPOTHYROIDISM ON THE BIOLOGY OF INGESTIVE BEHAVIOR AND METABOLIC PROFILE IN OFFSPRING OF RATS, Danielle Pereira Gaujac, São Cristóvão, 2013.

Recent experimental approaches attribute value to events occurring during intrauterine life as crucial in the onset of several diseases during postnatal life. Thyroid hormones (TH) are critical to the physiology of metabolism and body development. The aim of this study was to investigate the repercussions of lack of TH during pregnancy on body mass gain, metabolic profile, ingestive behavior of food, sodium (0.3M NaCl) and water in rat offspring at different postnatal ages. The experimental gestational hypothyroidism (EGH) was induced by the administration of 0.02% methimazole (MMI) in *ad libitum* drinking water from day 9 of gestation until delivery. Offspring (males and females) from MMI-treated dams (OMTD) were compared to their corresponding control offspring (i.e. male and female offspring from water-treated dams; OWTD). Insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT) were also performed. Two- or three-way ANOVA followed by Bonferroni post-test were performed when necessary. OMTD showed lower body weight on PND 23 and 30 ( $p < 0.0001$ ). Similar profile was observed when the offspring were separated by gender, at least during the experimental period (PND 60, 90 and 120;  $p < 0.0001$  for both genders). However, there was no difference in the amount of food intake when males of OMTD (m-OMTD) were compared to OWTD (m-OWTD). Female of OMTD (f-OMTD) had lower ability to reduce glucose plasma level at ITT ( $p = 0.0224$ ), otherwise, no change in GTT ( $p = 0.1313$ ) was observed. At PND 60, glucose plasma level was higher in f-OMTD than in f-OWTD ( $p = 0.013$ ). In m-OMTD, plasma cholesterol was higher in PND 60 and lower on PND 120 ( $p < 0.0001$ ), when compared to m-OWTD. In f-OMTD, cholesterol was lower only at PND 120 ( $p = 0.035$ ). The high density lipoprotein (HDL) cholesterol was lower in OMTD on PND 15 and 30 ( $p = 0.04$ ) and remained lower only in f-OMTD on PND 120 ( $p = 0.024$ ). Moreover, EGH induced an increased in plasma triglycerides (TGL), as well as, in serum level of very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol in offspring at DPN 15 ( $p = 0.039$ ) and also after puberty (at DPN 60), but only the m-OMTD ( $p < 0.0001$ ). The serum urea was lower in OMTD on PND 15 and 30. Interestingly, serum urea was inverted at DPN 60 in both, m- and f-OMTD ( $p = 0.006$ , and  $p = 0.003$ , respectively), when compared to their respective control groups. At PND 120, retroperitoneal fat weight was lower both in m- ( $p = 0.05$ ) and f-OMTD ( $p = 0.009$ ). Additionally, at all studied ages, relative kidney and liver mass was lower in m- ( $p = 0.001$ ) and f-OMTD ( $p = 0.008$ ). In conclusion, we demonstrated, for the first time, that maternal TH are critical to the ontogenetic development of systems that regulate energy metabolism throughout the life of the offspring, resulting in a reduction in body mass, biochemical instability throughout the life, lower sensitivity to insulin in females, and, a delay in the development of critical organs for the metabolism of macronutrients.

**Keywords:** congenital hypothyroidism; drinking behavior; eating; biological markers; rats; sex characteristics

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Procedimento experimental adotado nas mães (Painel A) e na prole (Painel B).....	29
<b>Figura 2.</b> Efeito do tratamento com metimazol do 9° DG ao 21° DG nos concentrações séricas de T3 (Painel A) e T4 totais (Painel B) das ratas prenhas.....	30
<b>Figura 3.</b> Efeito do HGE nos pesos dos órgãos normalizados pelo comprimento da tíbia das ratas prenhas.....	31
<b>Figura 4.</b> Efeito do HGE nas concentrações séricas de T3 (Painel A) e T4 totais (Painel B) da PME e PMH.....	32
<b>Figura 6.</b> Efeito do HGE na ingestão induzida de leite materno na prole aos 5 e 15 DPN. ...	35
<b>Figura 7.</b> Efeito do HGE na massa corporal e no comportamento de ingestão espontânea de ração, NaCl 0,3 M e água da prole. ....	36
<b>Figura 9.</b> Efeito do HGE no comportamento de ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M) e água da prole. ....	38
<b>Figura 11.</b> Efeito do HGE no Teste de Tolerância à Glicose (TTG) da prole aos 120 DPN..	39
<b>Figura 13.</b> Efeito do HGE no Teste de Tolerância à Glicose (TTG) na prole aos 120 DPN..	41
<b>Figura 14.</b> Efeito do HGE na concentração sérica de Glicose na prole.....	42
<b>Figura 15.</b> Efeito do HGE na concentração sérica de Colesterol da prole.....	43
<b>Figura 17.</b> Efeito do HGE na concentração sérica de HDL da prole.....	45
<b>Figura 18.</b> Efeito do HGE na concentração sérica de VLDL da prole.....	46
<b>Figura 19.</b> Efeito do HGE na concentração sérica de Ureia da prole.....	47
<b>Figura 21.</b> Efeito do HGE no peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia da prole.....	49

**Figura 22.** Efeito do HGE no peso da gordura retroperitoneal normalizada pelo comprimento da tíbia da prole.....50

**Figura 24.** Efeito do HGE no peso dos rins normalizado pelo comprimento da tíbia da prole .....52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL – ácidos graxos livres

AMPc- monofosfato cíclico de adenosina

ANGII – angiotensina II

ANOVA – análise de variância

ATPase – enzima adenosina trifosfato

CEPA – comitê de ética em pesquisa com animais

CEPT – proteína transportadora de ésteres de colesterol

CONCEA – conselho nacional de controle de experimentação animal

CYP7A1 – colesterol 7- $\alpha$ -hidroxilase

D1 – deiodase tipo 1

D2 – deiodases tipo 2

D3 – deiodases tipo 3

DG – dias de gestação

DPN – dia pós-natal

f-PME – fêmeas prole de mães eutireoideanas

f-PMH – fêmeas prole de mães hipotireoideanas

GH – hormônio do crescimento

GLUT 2 - transportador de glicose 2

GLUT 4 – transportador de glicose 4

hCG – gonadotropina coriônica humana

HDL – lipoproteína de alta densidade

HGE – hipotireoidismo gestacional experimental

HHT – hipotálamo pituitária tireóide

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

HTs – Hormônios Tireoideanos

I - iodeto

LDL – lipoproteína de baixa densidade

ME – mães eutireoideanas

MH – mães hipotireoideanas

m-PME – machos prole de mães eutireoideanas

m-PMH – machos prole de mães hipotireoideanas

MTZ – metimazol

NE – noradrenalina

PHA – para-aminohipurato

PME – prole de mães eutireoideanas

PMH – prole de mães hipotireoideanas

PTU – propiltiouracil

r'T3 – T3 reverso

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucleico mensageiro

S14 - Spot 14

SNC – sistema nervoso central

SREBP – *steroid regulatory element binding protein*

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

TG – tireoglobulina

TGL – triglicerídeos

TGO – transaminase glutâmica oxalacética sérica

TGP – transaminase glutâmica pirúvica sérica

TRH – hormônio liberador de tireotropina

TRs – receptores tireoideanos

TSH – hormônio estimulante da tireóide

TTG – teste de tolerância à glicose

TTI – teste de tolerância à insulina

UFS – Universidade Federal de Sergipe

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA .....	3
2.2 SÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	4
2.2 ATIVIDADE DAS DEIODASES .....	5
2.3 RECEPTORES TIREOIDIANOS.....	7
2.4 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DO EIXO HIPOTÁLAMO HIPÓFISE TIREÓIDE.....	7
2.5 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREÓIDE EM HUMANOS .....	8
2.6 Desenvolvimento da Glândula Tireóide em Ratos .....	9
2.7 Função Tireoidenana e Gestação .....	10
2.8 Hipotireoidismo e Gestação .....	11
2.10 Hormônios Tireoidianos e Metabolismo .....	12
2.10.1 Metabolismo dos Carboidratos .....	12
2.10.2 Metabolismo Lipídico.....	14
2.10.3 Metabolismo das Proteínas .....	16
2.11 Ingestão de Sódio e Hormônios Tireóideanos .....	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral .....	21

3.2 Objetivos Específicos .....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Animais utilizados .....	22
4.2 Acasalamento.....	23
4.3 Droga utilizada .....	23
4.4 Medidas e Índices Corporais .....	23
4.4.1 Massa Corporal.....	23
4.4.2 Relação peso órgão/comprimento da tíbia.....	24
4.5 Comportamento de Ingestão .....	24
4.5.1 Estimativa da ingestão induzida de leite materno .....	24
4.5.2 Comportamento da ingestão espontânea de ração, água e sódio .....	24
4.5.3 Estudo das respostas dipsogênica e natriorexigênica induzida pela depleção de sódio ..	25
4.6 Método de eutanásia e coleta do material.....	26
4.7 Medidas de concentrações séricas de hormônios .....	26
4.7.1 Hormônios Tireoidianos .....	26
4.8 Medidas de parâmetros bioquímicos .....	26
4.8.1 Glicemia .....	26
4.8.2 Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTI).....	27
4.8.3 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (TTG).....	27
4.8.4 Colesterol e Triacilglicerol .....	27
4.8.5 Ureia .....	28

4.8.6 Hematócrito .....	28
4.9 Delineamento experimental.....	28
4.10 Planejamento estatístico .....	29
5 RESULTADOS .....	30
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO.....	64
8 REFERÊNCIAS .....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Inúmeras alterações orgânicas, comumente diagnosticadas atualmente, não têm suas etiologias seguramente determinadas. Neste contexto, recentes abordagens experimentais têm imputado valor aos eventos ocorridos durante a vida intrauterina como favoráveis no aparecimento dessas doenças em diferentes momentos da vida pós-natal (ENTRINGER *et al.*, 2011; FOWDEN; FORHEAD, 2004).

O desenvolvimento intrauterino é um processo complexo e dinâmico que se caracteriza pela interação de fatores maternos e fetais. O desenvolvimento fetal adequado depende de condições ideais para a manutenção dos índices de proliferação, crescimento e diferenciação celular adequados, característicos deste processo. Assim, distúrbios no suprimento de macro e micronutrientes, oxigênio e hormônios durante a gestação, ou a exposição indevida à agentes potencialmente deletérios, podem comprometer o desenvolvimento do feto e resultar em consequências na sua vida adulta (FOWDEN *et al.*, 2006; KANAKA-GANTENBEIN, 2010).

Os hormônios tireoidianos (HTs) exercem ações fisiológicas essenciais na regulação do crescimento e desenvolvimento dos diversos sistemas orgânicos, sobretudo no sistema nervoso central e na modulação de várias rotas metabólicas, por meio de alterações no consumo de oxigênio e mudanças no metabolismo das proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas. Os HTs também afetam a síntese e degradação de outros hormônios e fatores de crescimento e, assim, indiretamente, influenciam a sinalização endócrina. A integração dos efeitos mediados por esses hormônios permite alterações metabólicas necessárias para o adequado desenvolvimento tecidual (GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008; SMITH *et al.*, 2002).

A carência na produção ou na atuação dos hormônios tireoideanos leva ao quadro de hipotireoidismo (PATEL *et al.*, 2011). As disfunções tireoidianas durante o período

gestacional são descritas variando entre 0,3 e 10% em diferentes estudos (KLEIN *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2010; VAIDYA *et al.*, 2007). Neste contexto, ressalta-se que durante a gestação o feto encontra-se inapto a suprir, sozinho, as suas necessidades de HTs, assim, o suprimento materno desses hormônios são essenciais para o desenvolvimento adequado do feto.

Os HTs promovem alterações generalizadas na massa muscular e atuam diretamente no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (SNC) (FOWDEN; SILVER, 1995). As ações moleculares desses hormônios modificam a expressão de receptores hormonais, de canais iônicos, de transportadores e de proteínas do citoesqueleto (PASCUAL; ARANDA, 2012). Essas ações pontuais, em tecidos específicos, induzidas por alterações nas concentrações dos HTs, produzem alterações morfológicas e funcionais nos diversos sistemas orgânicos. A ocorrência dessas alterações devido a quantidades insuficientes dos HTs, durante a vida intrauterina, pode predispor diversos tecidos a deflagrar mecanismos fisiopatológicos mais tardiamente, ao longo da vida adulta (FOWDEN; FORHEAD, 2004).

Neste contexto, o presente estudo pretende avaliar as repercussões do hipotireoidismo gestacional experimental (HGE) no desenvolvimento de alterações metabólicas, hormonais e nos comportamentos ingestivos de sódio, água e ração ao longo da vida pós-natal da prole.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA

O desenvolvimento intrauterino corresponde a um processo complexo e dinâmico que, para sustentar o ótimo crescimento e a sobrevivência fetal, requer a interação entre fatores maternos e fetais. O desenvolvimento normal só é possível se as condições necessárias para a manutenção dos altos índices de proliferação, crescimento e diferenciação, característicos desse processo, existirem. Assim, distúrbios no suprimento de macro e micro nutrientes, oxigênio e/ou hormônios durante a gestação, podem comprometer o desenvolvimento do feto e resultar em consequências na vida adulta (WARNER; OZANNE, 2010).

De acordo com a hipótese da origem fetal das doenças adultas, o ambiente intrauterino, devido à plasticidade característica do período do desenvolvimento, pode permanentemente influenciar o binômio saúde-doença a longo-prazo. Desta forma, a restrição do crescimento intrauterino, devido tanto a fatores maternos, como placentários e genéticos, podem permanentemente alterar o estado endócrino-metabólico do feto (KANAKA-GANTENBEIN, 2010).

Essa hipótese foi inicialmente proposta por Barker e colaboradores que realizaram estudo epidemiológico nas cidades inglesas de Hertfordshire, Preston e Sheffield (BARKER, 1993, 1996). No estudo foi demonstrado que a mortalidade por doença coronariana era duas vezes maior nos indivíduos que se localizavam no limite inferior da curva de distribuição do peso ao nascimento. Para explicar este fenômeno, o autor propôs o que hoje é denominado “Hipótese de Barker”. Segundo ele, períodos de rápida divisão celular ocorrem durante o desenvolvimento do feto, conhecido como períodos críticos, nos quais são formados os

diversos órgãos e tecidos. Eventos ocorridos durante estes períodos podem alterar a estrutura e função dos sistemas em desenvolvimento gerando consequências precoces (alteração no peso ao nascimento) e/ou tardias (doenças na vida adulta).

O conjunto destes e de outros estudos geraram o conceito de plasticidade de desenvolvimento (em inglês “developmental plasticity”) definido como um processo por meio do qual diferentes genótipos podem resultar na presença de um único fenótipo em resposta a estímulos ambientais durante a vida intrauterina. Esses estímulos têm implicações adicionais, considerando que seus efeitos podem ser transferidos e perpetuados entre gerações por meio de mecanismos epigenéticos (DRAKE; WALKER, 2004).

Os hormônios exercem importante função na regulação do crescimento e desenvolvimento, de modo que a concentração e bioatividade destes variam em resposta a muitas das alterações ambientais que conhecidamente causam a programação intrauterina. No caso dos HT, por serem lipossolúveis e atravessarem a placenta, a resposta adaptativa do feto a condições adversas, reflete tanto a atividade das glândulas endócrinas maternas quanto fetais. O período em que o insulto ocorre, nos diferentes tecidos, é importante para a determinação dos efeitos programados, tendo em vista que na organogênese vários sistemas apresentam padrões de crescimento intrínsecos (GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008).

## 2.2 SÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A glândula tireóide é constituída por uma grande quantidade de folículos preenchidos pela substância colóide. Estas células foliculares, que compõem a estrutura do folículo, sintetizam uma proteína denominada tireoglobulina (TG) e a secreta nos folículos da tireóide (KIRSTEN, 2000). Cada molécula de tireoglobulina contém o aminoácido tirosina em sua composição, sendo esta a base de construção para os hormônios tireoidianos (CARAYANNIOTIS, 2007).

A síntese de hormônios tireoidianos está diretamente ligada ao iodo e envolve três passos básicos (CARAYANNIOTIS, 2007). Primeiramente, o iodo proveniente da dieta é

absorvido pelo trato digestório e transportado por proteínas da membrana basal das células foliculares para o citoplasma, mantendo as concentrações intracelulares de iodo sempre mais elevadas que no fluido extracelular (GLUZMAN; NIEPOMNISZCZE, 1983). Logo após, o iodo migra para a superfície apical, onde é oxidado e convertido para sua forma ativa (I) pela enzima tireoperoxidase (COOPER, 1984). A tireoperoxidase é responsável pela catálise da incorporação do I aos resíduos tirosina e pela ligação das moléculas de iodotirosina na tireoglobulina, a qual determinará a formação dos hormônios tireoidianos. A tireoglobulina, produzida no citoplasma da célula da tireóide, é depositada no lúmen folicular, servindo como matriz para a síntese e o armazenamento dos hormônios tireoidianos (BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE, 2003). Por fim, as moléculas de tirosina iodinadas são agrupadas formando as moléculas dos hormônios tireoidianos. Uma di-iodotironina acrescida de uma mono-iodotirosina resultará em tri-iodotironina (T3), já duas di-iodotironinas irão formar a tiroxina (T4).

Após a sua formação, uma parte dos HTs fica armazenado e uma parte é liberado pela ação do hormônio estimulante da tireóide (TSH). A produção diária de T3 é de aproximadamente 20% em relação à produção total, essa quantidade é liberada diretamente na circulação pela glândula tireóide, já que a maior parte da conversão de T4 em T3 se dá em tecidos periféricos (CASSIO *et al.*, 2003). Este processo no qual o precursor do T4 é convertido na forma ativa do hormônio T3 é conhecido como deiodação central e periférica (WU *et al.*, 2005).

## 2.2 ATIVIDADE DAS DEIODASES

As reações de deiodação são catalisadas por três enzimas, denominadas iodotironinas deiodases tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3). Essas enzimas possuem características distintas baseadas na distribuição tecidual, substrato de preferência, cinética e sensibilidade à inibidores (BIANCO *et al.*, 2002; ST GERMAIN; GALTON, 1997).

A atividade coordenada das deiodases nos diferentes tecidos confere homeostase plasmática dos HTs, assim como uma adequada exposição dos tecidos a esses hormônios. A concentração tecidual de T3 varia conforme o transporte do hormônio para o tecido e a

atividade local das deiodases, capazes de aumentar ou diminuir o T3, independente das concentrações séricas dos HTs (SILVA; LARSEN, 1983).

A D1 é uma proteína integral de membrana, localizada na membrana plasmática. Em ratos, essa enzima é encontrada principalmente na tireóide, fígado, rim, hipófise, sistema nervoso central (SNC), intestino e músculo (BIANCO *et al.*, 2002; CHOPRA; TAING; MIKUS, 1996; LISBOA *et al.*, 2003). Sua síntese aumenta em resposta aos HTs, tanto em ratos como em humanos (BIANCO *et al.*, 2002). Alguns fatores podem modular a síntese e/ou atividade da D1, tais como os glicocorticóides, estrógeno, testosterona, citocinas, hormônio do crescimento (GH), prolactina, leptina, insulina e estado nutricional (BATES *et al.*, 2000; BECKETT *et al.*, 1989; BEHNE *et al.*, 1990; HARRIS *et al.*, 1978; LISBOA *et al.*, 2003; LOPRESTI *et al.*, 1989; PEKARY *et al.*, 1994). A D1 apresenta sua atividade aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo, sendo bloqueada pelo uso de propiltiouracil (PTU), um composto antitireoidiano que inibe a atividade da tireoperoxidase e, por conseguinte, a biossíntese dos HTs (CHOPRA; TAING; MIKUS, 1996).

A D2 é uma proteína transmembrana, localizada no retículo endoplasmático. Essa enzima é altamente expressa no SNC, na hipófise, no tecido adiposo marrom e placenta. A D2 regula a concentração intracelular de T3, sobretudo onde a concentração de T3 é crítica (SILVA; LARSEN, 1985). Tem a sua atividade elevada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo, sendo insensível ao PTU, porém inibida pela T4 e triiodotironina reversa (rT3) (KÖHRLE, 1999).

A D3 é a principal enzima inativadora dos HTs, localizada na membrana plasmática, com maior parte de sua molécula na face extracelular. Esta enzima é muito expressa nos tecidos em desenvolvimento, principalmente no SNC, embora também seja detectada em tecidos como pele, placenta e fígado de humanos e ratos (BATES *et al.*, 2000). A D3 apresenta sua atividade aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo. No entanto, gera apenas produtos inativos, rT3 e T2, a partir do T4 e T3, pois atua removendo o iodo da posição 5 destas iodotironinas (CROTEAU *et al.*, 1995).

### 2.3 RECEPTORES TIREOIDIANOS

As ações biológicas dos HTs dependem de forma importante de sua interação com receptores de alta afinidade (receptores tireoidianos - TRs), localizados no núcleo das suas células alvo. Essa família de receptores é subdividida em três grupos específicos: TR1, TR2 e TR3. Vários subtipos de receptores tireoidianos foram identificados: TR- $\alpha$ 1, TR- $\alpha$ 2, TR- $\beta$ 1, TR- $\beta$ 2.

O TR- $\alpha$ 1 e TR- $\beta$ 1 são as formas biologicamente ativas desses receptores, enquanto que o TR- $\alpha$ 2 diminui a capacidade de ligação do T3, apresentando ação inibitória sobre a atividade do T3 (BAXTER; TYRRELL, 1994; ROBERTS; LADENSON, 2004). Os receptores TR- $\beta$ 1 e TR- $\beta$ 2 contribuem para a regulação da liberação do hormônio liberador de tireotropina (TRH). Estes receptores possuem papel chave no mecanismo de *feedback* negativo que os HTs circulantes desempenham sobre a produção hipotalâmica e pituitária de TRH e TSH, respectivamente (DUPRÉ *et al.*, 2004).

Os HTs classicamente regulam a expressão gênica ao se ligar a receptores tireoidianos de alta afinidade que reconhecem elementos de respostas específicas por meio de genes alvos, tal efeito resulta na ativação ou inibição da transcrição desses genes. Entretanto, alguns efeitos dos HTs ocorrem rapidamente e não são afetados por inibidores de transcrição e tradução, devido à mediação do T3 em ações não-genômicas (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003).

A ação não-genômica ocorre pela regulação de canais iônicos, fosforilação oxidativa e transcrição gênica mitocondrial que envolve a geração de segundos mensageiros intracelulares e indução de cascata de sinalização levando a um aumento da concentração de cálcio intracelular, de monofosfato cíclico de adenosina (AMP-c) e ação das proteínas quinases (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003).

### 2.4 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DO EIXO HIPOTÁLAMO HIPÓFISE TIREÓIDE (HHT)

O eixo HHT é o principal regulador da função tireoidiana. Neurônios hipotalâmicos produtores de TRH possuem seus pericários localizados predominantemente no núcleo paraventricular (BAXTER; TYRRELL, 1994; VOLPATO; NUNES, 2001). Seus terminais

axonais fazem contatos sinápticos com capilares da cápsula externa da eminência média do hipotálamo onde liberam o TRH. Após a captação capilar, o neuropeptídeo alcança os tireotrofos hipofisários pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário, provendo a secreção de tireotropina, ou TSH. O TSH estimula a síntese de tireoglobulinas, o processo de sequestro de iodeto e todas as etapas subsequentes para a formação de T3 e T4 (BAXTER; TYRRELL, 1994).

As ações que os HTs desencadeiam nas células alvo repercutem em efeitos biológicos marcantes na atividade dos vários tecidos e sistemas, os quais, em geral, têm sua atividade bastante elevada quando sob a ação destes hormônios, os quais elevam a expressão e a atividade de várias enzimas do metabolismo oxidativo, ATPases, transportadores iônicos e proteínas importantes para o desenvolvimento de várias funções específicas dos mesmos. De modo que alterações nas concentrações desses hormônios, detectadas nas disfunções tireoidianas, produzem efeitos importantes nas atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas promovendo alterações metabólicas (VOLPATO; NUNES, 2001).

## 2.5 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREÓIDE EM HUMANOS

A glândula tireóide é a primeira glândula fetal endócrina a se desenvolver e isso começa na terceira semana de gestação. Para isso, inicialmente se forma como uma evaginação na linha media do assoalho anterior da faringe, visível por volta do 16°-17° dias de gestação. A glândula tireóide migra caudalmente, permanecendo ligada ao assoalho da faringe, pelo ducto tireoglosso, e atinge sua posição final por volta da sétima semana de gestação, e sua definição, forma bilateral pela associação entre o primórdio da tireóide medial e lateral por volta da oitava semana de gestação. Os folículos tireoidianos são submetidos a três estágios de desenvolvimento, o estágio pré-coloidal (7<sup>a</sup>-13<sup>a</sup> semana), o estágio de início de coloide (13<sup>a</sup> – 14<sup>a</sup> semana) e a fase folicular (a partir da 14<sup>a</sup> semana). A tireoglobulina, que fornece a matriz para a síntese dos HTs e do veículo subsequente para o armazenamento é detectada na 5<sup>o</sup> semana gestacional (FISHER; KLEIN, 1981).

A captura de iodo pela tireóide é detectável na 12<sup>o</sup> semana gestacional, durante a fase pré-coloidal, e a primeira indicação da produção de T4 ocorre duas semanas depois, durante a

fase final de formação do lúmen folicular. No hipotálamo, o TRH é detectado por volta de 8ª - 9ª semana de gestação, e o seu conteúdo aumenta progressivamente. O sistema hipotálamo-hipófise é histologicamente detectável na 9ª semana, e o TSH está presente na pituitária entre 10ª -12ª semana. As concentrações de TSH e T4 permanecem com o nível baixo até a metade da gestação. Por volta das 18ª – 20ª semanas de gestação tanto a captação de iodo pela tireóide fetal quanto as concentrações séricas de T4 começam a aumentar (FISHER; KLEIN, 1981; FISHER *et al.*, 2000).

## 2.6 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA TIREÓIDE EM RATOS

Em ratos, a glândula tireóide já se encontra bem formada, porém não completamente, no 17º dia embrionário e neste período ela já é capaz de concentrar tireoglobulina e iodeto, apesar do conteúdo ainda muito pequeno (FELDMAN; VAZQUEZ; KURTZ, 1961; THORPE-BEESTON; NICOLAIDES; MCGREGOR, 1992). Estudo demonstrou que a tireóide do rato encontra-se pronta para a produção hormonal por volta do vigésimo dia embrionário, quando esta adquire a maior parte das características de uma glândula adulta (FELDMAN; VAZQUEZ; KURTZ, 1961).

Basicamente, a fonte hormonal do embrião é materna. Assim, experimentos demonstraram que até mesmo pequenas deficiências de iodo materno são capazes de diminuir as concentrações de T4 do feto, isto implica que as concentrações adequadas de T4 no soro materno são fundamentais para a manutenção das concentrações adequadas deste hormônio no embrião e para adequada conversão local em T3 (KLEIN *et al.*, 2001). A detecção do hormônio no embrião do rato acontece já no nono dia embrionário, com concentrações diferentes de T3 e T4, sendo o T3 mais abundante (WOODS; SINHA; EKINS, 1984).

Estudo realizado por Woods *et al.* (1984) demonstrou que os embriofoblastos do feto de rato apresentavam uma concentração de 21% do valor de T4 e 54% do valor de T3 materno (WOODS; SINHA; EKINS, 1984). As concentrações totais de T3 e T4 aumentam significativamente do 18º dia gestacional até o nascimento devido à maturação da glândula tireóide. Após o nascimento, os concentrações plasmáticas de T4 sobem de forma acentuada até atingir um pico no décimo sétimo dia pós-natal (FISHER *et al.*, 1976), seguidos por uma

elevação, em paralelo, das concentrações de T3, que irão atingir seu pico por volta do vigésimo oitavo dia pós natal . As concentrações totais de T3, que serão padrão em ratos adultos são alcançados no 40° dia pós-natal.

Os HTs são fundamentais para o desenvolvimento do cérebro (SOLIS; VALVERDE, 2006). O início do desenvolvimento do tubo neural em ratos, por volta do oitavo dia embrionário, coincide com o início do desenvolvimento da tireóide e, de certa forma, com o surgimento dos receptores para hormônios tireóideanos. O ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) responsável pela expressão dos genes dos receptores para HTs, foi detectado no SNC de ratos, durante o desenvolvimento embrionário, por volta do décimo primeiro e décimo quinto dia de gestação. Sendo que a expressão do RNAm dos receptores de HTs foi detectada em diferentes regiões do cérebro de ratos no décimo quarto dia embrionário (BRADLEY; TOWLE; YOUNG, 1992).

## 2.7 FUNÇÃO TIREOIDIANA E GESTAÇÃO

A gestação normal é caracterizada por significativas mudanças no funcionamento da tireóide e no metabolismo do iodo (CASEY; LEVENO, 2006; GLINOER, 1997; KRASSAS; POPPE; GLINOER, 2010; SMALLRIDGE *et al.*, 2005). A tireóide fetal se desenvolve durante o final do primeiro trimestre, mas não é totalmente funcional, em termos de secreção dos HTs, até por volta da 14ª semana de gestação. Atualmente, é bem aceito que o desenvolvimento fetal, particularmente a maturação neuronal, é dependente de uma adequada concentração de T4 disponível nos tecidos fetais, que é então convertido a T3 para iniciar a ação dos HTs (MORREALE DE ESCOBAR; OBREGÓN; ESCOBAR DEL REY, 2000).

Durante o primeiro trimestre, o T4 fetal é derivado somente da circulação materna deste hormônio transportado pela placenta. Adicionalmente, os HTs transportados da mãe para o feto continuam por toda gestação. A necessidade fetal de T4 aumenta no final do primeiro trimestre e o efeito desta mudança na concentração circulante placentária é derivada da gonadotropina coriônica humana (hCG) que possuem taxas aumentadas nesse período (GLINOER, 1998). Como a hCG e o TSH possuem em comum a subunidade  $\alpha$ , o primeiro é um estimulador fraco da tireóide, que permite um aumento da concentração de T4 materna, resultando no aumento do transporte hormonal para o feto. O aumento da circulação materna

na concentração de hCG resulta numa recíproca diminuição no TSH durante o primeiro trimestre.

Então, a maior mudança no funcionamento da tireóide associada ao período gestacional é na necessidade do aumento da produção dos HTs que são dependentes diretamente de um adequado suprimento na dieta de iodo e da integridade da glândula tireóide. De modo que a ingestão insuficiente de iodo modifica a homeostase fisiológica das concentrações circulantes de HTs (GLINOER, 2007; PEARCE, 2009; SMALLRIDGE *et al.*, 2005).

## 2.8 HIPOTIREOIDISMO E GESTAÇÃO

Durante a gestação as anormalidades da função tireoidiana podem acometer cerca de 10% das mulheres gestantes (GLINOER, 1998; LAZARUS, 2005). A prevalência de hipotireoidismo durante a gestação é estimada em 0,3% a 2,5% em diferentes países (SMALLRIDGE *et al.*, 2005), sendo o hipotireoidismo congênito, devido à deficiência de iodo, uma das causas mais comuns e tratáveis de deficiência mental no recém-nascido (BROWN *et al.*, 1981).

No período gestacional, é fundamental o diagnóstico precoce do hipotireoidismo, uma vez que este pode trazer consequências para o conceito e para a própria gestante (LAZARUS, 2005). Neste período, o organismo materno sofre uma série de modificações hormonais e metabólicas e a ocorrência de alguma falha na adaptação destas mudanças fisiológicas resulta em disfunções tireoidianas (MÄNNISTÖ *et al.*, 2010). As mudanças que ocorrem na função tireoidiana na gestação são sutis, quando a glândula e a ingestão de iodo são normais. Contudo, o estresse da doença autoimune e/ou a deficiência de iodo são suficientes para resultar em hipotireoidismo gestacional em algumas mulheres (SMYTH *et al.*, 1999).

De Vivo *et al.* (2010) demonstraram que concentrações adequadas de HTs fetais são necessárias desde o início da gestação para se atingir um desenvolvimento neurológico adequado (DE VIVO *et al.*, 2010). Pois, no início da vida fetal, o organismo é totalmente dependente dos HTs maternos, e somente por volta da 11ª semana, a tireóide fetal começa a

captar iodeto e, no meio da gestação, por volta da 18<sup>a</sup>-20<sup>a</sup> semana, passa a secretar seus próprios hormônios (FISHER; KLEIN, 1981).

A placenta tem função tanto na captação como no armazenamento de iodo, sendo um meio possível de proteger o feto de inadequações na ingestão de iodo pela dieta materna (KRAJEWSKI; BURMAN, 2011). No entanto, a placenta parece ser incapaz de compensar o hipotireoidismo materno. No início da gravidez, quando as concentrações adequadas de HTs fetal são cruciais para o desenvolvimento neurológico normal, as concentrações de T4 encontrados no cérebro fetal refletem as concentrações de T4 maternos. Isto sugere a ausência de um mecanismo de *feedback* das concentrações de HTs materno na transferência materno-fetal de HTs (CHAN; VASILOPOULOU; KILBY, 2009; FERNHOFF, 1998).

A deficiência de iodo no período gestacional promove um importante esforço na capacidade da tireóide de se adaptar ao aumento da necessidade na produção de HTs, levando a hipotiroxinemia com aumento sérico nos concentrações de TSH e, algumas vezes, com a formação de bócio (KRASSAS; POPPE; GLINOER, 2010). Essa deficiência de iodo pode levar a danos cerebrais ao feto e produzir sequelas neurológicas graves. Vários estudos demonstraram que a deficiência de iodo leve ou limítrofe está associada a anomalias do desenvolvimento e deficiências intelectuais do feto (FENZI *et al.*, 1990; GLINOER, 1999; VERMIGLIO *et al.*, 1990).

## 2.10 HORMÔNIOS TIREOIDIANOS E METABOLISMO

Por suas inúmeras ações biológicas em diferentes tecidos, os HTs são fundamentais para o funcionamento normal do organismo. Estes hormônios promovem efeitos no metabolismo energético, de nutrientes e íons inorgânicos, na termogênese, no crescimento normal e no desenvolvimento de vários tecidos em períodos críticos.

### 2.10.1 Metabolismo dos Carboidratos

Os HTs constituem mediadores importantes do metabolismo corporal e afetam vários aspectos metabólicos envolvidos no metabolismo da glicose e insulina, por meio de uma variedade de mecanismos. Ademais, os HTs desempenham função chave na regulação e

ativação do receptor de insulina e proteínas transportadoras de glicose nas vias de sinalização (AMATI *et al.*, 2009).

Os HTs controlam diretamente a secreção de insulina. No hipotireoidismo existe uma redução da secreção de insulina pelas células- $\beta$  em resposta à glicose. A resposta dessas células à glicose ou catecolaminas é aumentada no hipertireoidismo devido ao aumento da massa de células- $\beta$  (MITROU; RAPTIS; DIMITRIADIS, 2010; STANICKÁ *et al.*, 2005).

A resistência à insulina tem sido reportada por ser causada pelo hipotireoidismo em vários estudos *in vivo* e *in vitro* (CETTOUR-ROSE *et al.*, 2005; DIMITRIADIS *et al.*, 1997; DUBANIEWICZ *et al.*, 1989), nos quais foram evidenciados que os músculos tornam-se menos responsivos na condição de hipotireoidismo.

A resistência à insulina pode estar associada a uma regulação negativa de uma ou mais enzimas envolvidas no metabolismo da glicose. Uma translocação prejudicada dos transportadores GLUT4 na membrana plasmática tem sido observada em monócitos de sujeitos com hipotireoidismo (MARATOU *et al.*, 2009). O músculo esquelético de ratos hipotireoideanos apresenta uma redução da taxa de síntese de glicogênio à concentrações de insulina supra fisiológicas, bem como redução da taxa de oxidação da glicose a todas as concentrações de insulina (DIMITRIADIS *et al.*, 1997, 1989).

A redução da absorção de glicose pelo trato gastrointestinal (TGI) acompanhada por aumento prolongado de glicose periférica, gliconeogênese e diminuição de produção hepática de glicose são marcas do hipotireoidismo. No hipotireoidismo subclínico, a redução na concentração de insulina estimulada pela glicose causada por perturbação da expressão do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) pode levar à resistência à insulina. Além disso, devido ao *clearance* renal da insulina estar reduzido, as necessidades fisiológicas de insulina são diminuídas (WANG, 2013).

O hipertireoidismo tem sido associado à resistência à insulina devido ao elevado *turnover*, o que acarreta em aumentando da absorção intestinal de glicose, da produção hepática de glicose, da concentração de ácidos graxos livres (AGL), das concentrações de

insulina de jejum e/ou pós-pandrial, e do transporte periférico de glicose acompanhado por sua utilização (BRENTA *et al.*, 2009; DIMITRIADIS; RAPTIS, 2001). No hipertireoidismo, a produção endógena de glicose é intensificada e a sensibilidade à ação da insulina é diminuída (CAVALLO-PERIN *et al.*, 1988), devido à glicogênese e glicogenólise.

Existe um aumento da utilização de glicose no músculo esquelético no estado de hipertireoidismo (DIMITRIADIS; RAPTIS, 2001). O aumento da utilização de glicose tem sido reportado pela mediação da insulina estimulando a taxa de oxidação da glicose (DIMITRIADIS *et al.*, 1985; FOSS *et al.*, 1990; MCCULLOCH *et al.*, 1983).

No hipertireoidismo, a taxa de produção endógena de glicose está aumentada e não responde a supressão dos efeitos da insulina (DIMITRIADIS *et al.*, 1985; MCCULLOCH *et al.*, 1983; MÜLLER; SEITZ, 1980). Esses efeitos dos HTs podem ser explicados por: 1) o aumento da taxa de gliconeogênese e glicogenólise (MCCULLOCH *et al.*, 1983; MÜLLER; SEITZ, 1980; SANDLER *et al.*, 1983); 2) aumento da taxa de formação de lactato no músculo e tecido adiposo (Ciclo de Cori) (DIMITRIADIS *et al.*, 2004); 3) aumento da secreção e efeito do glucagon e adrenalina nas células do fígado (KABADI; EISENSTEIN, 1980; MÜLLER; SEITZ, 1980); 4) aumento da proteólise no músculo promovendo aumento do suprimento de aminoácidos para o fígado (RIIS *et al.*, 2008); 5) aumento do transporte de glicose pelo GLUT 2 na membrana plasmática das células do fígado, permitindo um rápido transporte de glicose (MOKUNO *et al.*, 1999; WEINSTEIN; O'BOYLE; HABER, 1994); 6) aumento da concentração de AGL no plasma (DIMITRIADIS *et al.*, 1985; SAUNDERS; HALL; SÖNKSEN, 1980). A resistência à ação da insulina no hipertireoidismo pode ser um efeito benéfico na prevenção do desenvolvimento de hipoglicemia (DIMITRIADIS; RAPTIS, 2001).

### **2.10.2 Metabolismo Lipídico**

A habilidade dos HTs para induzir vias anabólicas e catabólicas, tais como a lipogênese e lipólise, contribui para indução dos HTs no gasto energético (PUCCI; CHIOVATO; PINCHERA, 2000), baseado em vários mecanismos envolvendo esses efeitos, tais como a modulação da atividade simpática (SILVA, 2011). Os HTs estimulam a síntese

lipídica, mobilização e degradação, embora a degradação ocorra a altas taxas, especificadamente no hipertireoidismo (MÜLLER; SEITZ, 1984). Contrariamente, o hipotireoidismo, em pacientes ou modelos animais, está associado à alterações lipídicas caracterizadas pelo aumento do colesterol, e, em alguns casos, aumento dos triglicerídes (TGL) (EREM *et al.*, 1999; PUCCI; CHIOVATO; PINCHERA, 2000).

Concentrações séricas normais de HTs são essenciais para a manutenção do colesterol, e assim para satisfazer as necessidades corporais e regular vias críticas na síntese de colesterol, captação e metabolismo (REPA; MANGELSDORF, 1999). A sinalização dos HTs estimula a 3 hidroxil-3metil-glutaril-CoA (HMG CoA) redutase e a farnesil pirofosfato a favorecer a síntese de colesterol (NESS *et al.*, 1990) e aumentar a regulação do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), com conseqüente aumento da captação de colesterol (SHIN *et al.*, 2003). Adicionalmente, os HTs estimulam a colesterol 7- $\alpha$ -hidroxilase (CYP7A1), favorecendo o metabolismo do colesterol em ácido biliar (NESS *et al.*, 1990).

Os HTs estimulam a síntese hepática de ácido graxo, bem como a esterificação para TGL, por estimulação direta das seguintes enzimas limitantes: acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase (MÜLLER; SEITZ, 1984). Baseado no efeito direto na transcrição destas enzimas, os HTs promovem um rápido e importante aumento na expressão da Spot 14 (S14), uma proteína que é capaz de interagir fisicamente e funcionalmente com os receptores de HTs para regular a expressão genética da enzima málica (CHOU *et al.*, 2007). A elevação da expressão da S14 é importante para aumentar a expressão de enzimas lipogênicas induzidas por T3 (CUNNINGHAM *et al.*, 1998).

Os HTs regulam o metabolismo da LDL e HDL por uma variedade de vias. Alterações em enzimas que atuam nas lipoproteínas, incluindo a lipase lipoproteica (ABRAMS; GRUNDY; GINSBERG, 1981), lipase hepática e lecitina colesterol aciltransferase (VALDEMARSSON, 1983) foram observadas em distúrbios da função tireoideana. A hipercolesterolemia associada ao hipotireoidismo em ratos é atribuída, parcialmente, ao aumento do LDL e HDL plasmáticos (GROSS *et al.*, 1987). Foi observado redução no receptor que medeia o catabolismo da LDL em animais hipotireoideanos. A ausência de HTs está associada à redução no número de sítios de ligação do HDL, como o

fígado é um dos maiores locais de catabolismo da HDL, a redução da capacidade de ligação da HDL no fígado pode explicar a redução do *clearance* plasmático da HDL e, assim, o aumento plasmático do HDL observado no hipotireoidismo (GROSS *et al.*, 1987).

O padrão lipídico no hipotireoidismo é caracterizado pelo aumento do colesterol total e LDL e concentrações aumentadas ou normais de HDL. O mecanismo fisiopatológico destas anormalidades lipídicas tem sido determinado pela redução da biossíntese e degradação das lipoproteínas, com uma predominância da redução na via catabólica (STAELS *et al.*, 1990). A redução no número de receptores de LDL resulta em excesso de partículas de LDL, as quais circulam no plasma sendo propensas à oxidação. A baixa atividade das enzimas lipase lipoproteica e lipase hepática (LITHELL *et al.*, 1981; VALKONEN; KUUSI, 1998) tem sido extensamente descrita no hipotireoidismo, junto à redução da atividade da proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT) (TAN; SHIU; KUNG, 1998). Essas mudanças na atividade enzimática podem gerar concentrações aumentadas de lipoproteínas, promovendo alto potencial aterogênico (DOI *et al.*, 2000).

No hipertireoidismo, é observado um aumento na síntese e degradação de lipídeos, com uma predominância da via catabólica. Consequentemente, as concentrações plasmáticas de colesterol são reduzidas em pacientes hipertireoideanos (HEIMBERG; OLUBADEWO; WILCOX, 1985; RAZIEL *et al.*, 1982). Embora, esses resultados possam ser atribuídos parcialmente a má nutrição e ao baixo peso, a alta captação de colesterol dentro das células e sua larga excreção em sais biliares através do intestino podem contribuir para o efeito hipolipêmico observado nesses pacientes (ABRAMS; GRUNDY; GINSBERG, 1981; CHAIT; BIERMAN; ALBERS, 1979; O'BRIEN *et al.*, 1993).

### **2.10.3 Metabolismo das Proteínas**

Os HTs possuem importantes ações na homeostase da proteína e nitrogênio. Enquanto o hipertireoidismo e a administração exógena de HTs produzem estimulação da síntese e catabolismo (FLAIM; LI; JEFFERSON, 1978; SANDLER *et al.*, 1983) – usualmente o catabolismo prevalece –, o quadro de hipotireoidismo é caracterizado por

redução da síntese e catabolismo de proteínas (BURINI *et al.*, 1981; CRISPELL; KAHANA; HYER, 1956; FLAIM; LI; JEFFERSON, 1978).

Os HTs em excesso produzem um estado catabólico pelo aumento do gasto energético e do *turnover* de lipídeo, glicose e proteína. O aumento no *turnover* da proteína corporal ocorre antes de alterações no gasto energético e metabolismo da glicose e lipídeo. Essa observação indica que a estimulação do *turnover* de proteína é uma característica direta do hipertireoidismo. Em homens saudáveis tratados com T3 ocorre uma elevação de três vezes no T3 total e aumento de 21% da taxa metabólica basal. Gelfand *et al.* (1987) observaram aumento no gasto energético, no fluxo corporal de leucina e na excreção de nitrogênio (GELFAND *et al.*, 1987). Os autores concluíram que a administração em curto prazo de T3 aumenta o *turnover* corporal de fenilalanina e tirosina, refletindo um aumento da degradação e síntese proteica (GELFAND *et al.*, 1987; RIIS *et al.*, 2005).

Ainda no hipertireoidismo, é observado um aumento da concentração de aminoácidos de cadeia ramificada e redução da concentração plasmática de aminoácidos provenientes da gliconeogênese (WAHREN *et al.*, 1981). Os aminoácidos de cadeia ramificada são conhecidos por estimular a síntese proteica e inibir a degradação (LOUARD; BARRETT; GELFAND, 1995), e o aumento das concentrações sanguíneas desses aminoácidos no hipertireoidismo, pode, então, ser um mecanismo compensatório, preservando a proteína corporal da degradação. As concentrações circulantes de ácidos graxos livres, glicerol e corpos cetônicos são, em geral, elevados, e esses lipídeos intermediários tem sido apresentados como estimulantes do catabolismo proteico (TESSARI *et al.*, 1986). De maneira geral, a degradação e a síntese proteica estão elevadas no hipertireoidismo, suportando o conceito que os HTs são anabólicos e catabólicos (MÜLLER; SEITZ, 1984; SESTOFT, 1980).

Estudos prévios tem sugerido um favorecimento na conversão de aminoácidos à glicose no hipertireoidismo (FREEDLAND; KREBS, 1967; SANDLER *et al.*, 1983; WAHREN *et al.*, 1981), o que pode explicar a queda nas concentrações plasmáticas de aminoácidos glicogênicos. Enquanto a aumentada gliconeogênese pode contribuir para a perda de nitrogênio, também é evidenciado um aumento na taxa de oxidação de leucina, um

aminoácido não glicogênico. Assim, a perda de proteína corporal no hipertireoidismo, envolve uma conversão acelerada de aminoácidos à combustíveis oxidáveis, tais como a glicose (RIIS *et al.*, 2005).

A formação de ureia é a rota metabólica final de muitos aminoácidos nitrogenados. Os aminoácidos que não são utilizados para a síntese proteica são convertidos à ureia nos hepatócitos. Estudos *in vitro* demonstraram que a atividade das enzimas do ciclo da ureia é regulada pelas concentrações de HTs (GRILLO; FOSSA, 1966; GRILLO, 1964), mas em estudos com animais experimentais há divergências, pois são observadas tanto aumento como redução da síntese de ureia no hipotireoidismo (GRILLO; FOSSA, 1966). Marchesine *et al.* (1993) demonstraram que a formação de ureia em resposta à infusão de alanina foi significativamente reduzida em pacientes hipotireoideanos, e que a terapia de reposição com L-Tiroxina melhorou a dinâmica de síntese da ureia, a qual retomou a escala fisiológica (MARCHESINI *et al.*, 1993). Por outra via, a função quantitativa do fígado não foi alterada no hipotireoidismo, e não mudou com a terapia de L-Tiroxina. Portanto, os autores propuseram que a síntese reduzida de ureia, no quadro de hipotireoidismo, não pode ser relacionada a um defeito na função do fígado (MARCHESINI *et al.*, 1993).

O tratamento com PTU, para indução de hipotireoidismo em ratos, melhorou a síntese e diminuiu a degradação de N-acetilglutamato, um intermediário do metabolismo da ureia, no fígado (SHIGESADA; TATIBANA, 1971). Em outro estudo, foram realizados testes da função tireóidea e dos rins em pacientes com diagnóstico de hipotireoidismo (TSH > 10 µg/L) e com hipotireoidismo subclínico (TSH 6 – 9,9 µg/L). Houve um significativo aumento da ureia e creatinina em ambos os grupos quando comparados aos controles eutireoideanos. Entretanto, o aumento da creatinina foi correlacionado às concentrações de TSH nos sujeitos com hipotireoidismo diagnosticado (SAINI *et al.*, 2011).

## 2.11 INGESTÃO DE SÓDIO E HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

A ingestão de sódio pode ocorrer por duas maneiras: espontânea e induzida. A ingestão espontânea refere-se ao consumo de sal, por um animal hidratado, em excesso à necessidade diária de sódio, e a ingestão induzida, também chamada de apetite ao sódio,

refere-se ao consumo de sal desencadeado pela diminuição de volume do compartimento extracelular (ANTUNES RODRIGUES; COVIAN, 1963). Tratamentos que levam à desidratação extracelular, tais como diálise intraperitoneal, furosemida associada à dieta deficiente em sódio, furosemida associada ao captopril e privação hídrica, induzem apetite ao sódio mediado por hormônios natriorexigênicos, angiotensina II (ANG II) e aldosterona (SATO; YADA; DE LUCA, 1996).

A função renal e o metabolismo de sal e água são prejudicados nas alterações tireoideanas (BRADLEY *et al.*, 1974; VARGAS *et al.*, 2006). O hipotireoidismo em ratos provoca uma menor habilidade em concentrar urina, juntamente com natriurese aumentada após sobrecarga salina ou de água (EMMANOUEL; LINDHEIMER; KATZ, 1974; HOLMES; DISCALA, 1970; MICHAEL *et al.*, 1972; TAYLOR; FREGLY, 1964) e capacidade reduzida em preservar o sódio, produzindo um balanço de sódio negativo (FREGLY; BRIMHALL; GALINDO, 1962). Por outro lado, ratos tratados com T4 apresentam mudanças na hemodinâmica renal e reabsorção de sódio (VARGAS *et al.*, 2006), poliúria (GARCÍA DEL RIO *et al.*, 1997), reduzida habilidade em excretar sódio após sobrecarga de salina hipertônica (VARGAS *et al.*, 2006). Essas informações indicam que as alterações tireoideanas são acompanhadas por mudanças no balanço sódio renal (PEREZ-ABUD *et al.*, 2011).

Ratos hipotireoideanos desenvolvem um apetite ao sódio que está diretamente correlacionado ao baixo sódio renal (BELLÓ; COVIAN, 1991; FREGLY; ROWLAND, 1985; VENTURA *et al.*, 2001). Vários estudos tem demonstrado uma depressão na atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) nessa condição (FREGLY; ROWLAND, 1985; MARCHANT; BROWN; SERNIA, 1993; VENTURA *et al.*, 2001). O hipotireoidismo em ratos provoca redução da aldosterona o que resulta em perda urinária de sódio e, conseqüente, expressão compensatória do apetite ao sódio (FITZSIMONS, 1998; MARCHANT; BROWN; SERNIA, 1993; TAYLOR; FREGLY, 1964), por meio de uma resposta ingestiva exacerbada. Por essa razão, ratos hipotireoideanos desenvolvem uma inabilidade em manter o balanço de sódio (FREGLY; ROWLAND, 1985; TAYLOR; FREGLY, 1964, 1964).

O hipertireoidismo experimental em ratos induzido pela administração de tiroxina acrescido à dieta rica em sódio exacerbou a hipertensão, promoveu hipertrofia cardíaca e renal, além de aumento da albumina urinária e do balanço de sódio (PEREZ-ABUD *et al.*, 2011). Assim, o hipertireoidismo em ratos promove alteração na hemodinâmica renal (GARCÍA-ESTANÑ *et al.*, 1995), que pode prejudicar a manutenção do sódio renal e interferir na sua sensibilidade (PEREZ-ABUD *et al.*, 2011).

Em suma, sabe-se que os HTs promovem alterações generalizadas no metabolismo energético e atuam diretamente no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central (SNC). Nesse sentido, a ocorrência de hipotireoidismo materno durante a gestação apresenta grande potencial em gerar desordens transitórias ou definitivas ao longo da vida da prole. Assim, hipotetizamos que a deficiência de HTs na vida intrauterina produza alterações morfológicas e funcionais no sistema biológico, repercutindo em mudanças no comportamento ingestivo e no perfil bioquímico da prole ao longo da vida pós-natal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as repercussões da carência dos hormônios tireoidianos maternos durante a gestação na função metabólica, no comportamento ingestivo e na homeostase hidroeletrolítica da prole de ratas, do nascimento à vida adulta.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito do HGE:

- i. nos índices reprodutivos maternos;
- ii. na massa corporal das mães;
- iii. no peso dos órgãos das mães;
- iv. no perfil hormonal das mães e em diferentes fases da vida pós-natal da prole;
- v. na evolução da massa corporal ao longo da vida pós-natal da prole.
- vi. no comportamento de ingestão induzida de leite materno da prole;
- vii. no comportamento de ingestão espontânea de ração, de sódio e água em diferentes fases da vida pós-natal da prole;
- viii. no comportamento de ingestão induzida de água e sódio na vida pós-natal da prole;
- ix. na homeostase glicêmica da prole;
- x. nos parâmetros bioquímicos em diferentes fases da vida pós-natal da prole;
- xi. no peso dos órgãos em diferentes fases da vida pós-natal da prole.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério da Universidade Federal de Sergipe (UFS), dispostos em quatro categorias. A **Categoria I** formada por fêmeas adultas (150 a 200 g), utilizadas para dosagens hormonais. Essa categoria de ratas foi acompanhada para acasalamento programado. Cerca que 65% das ratas possuíam ciclo estral regular e emprenharam de modo programado. Confirmadas as gestações, um grupo de ratas prenhas foi submetido ao protocolo de indução de hipotireoidismo durante a gestação (grupo de mães hipotireoidianas; MH) ou grupo que recebeu veículo (grupo de mães eutireoidianas; ME). Foram realizadas decapitações para coleta de sangue para dosagens hormonais nos períodos correspondentes ao início da gestação (dia de gestação 0 - DG 0) e ao final da gestação (DG 21 ou DG 22). A **Categoria II**, constituída por fêmeas adultas dos grupos MH ou ME, foram acompanhadas para acasalamento programado, sendo as progenitoras dos ratos da **categoria III**. A **Categoria III** formada por ratos neonatos, machos e fêmeas, prole de mães eutireoidianas (PME) e prole de mães hipotireoidianas (PMH). Todos os neonatos foram provenientes das ratas prenhas da **categoria II**. A **Categoria IV** foi composta por machos adultos (250 a 300 g) para acasalamento com as fêmeas adultas da **categoria I e II**.

Durante todo o período, os animais tiveram livre acesso à água e a comida. As salas de manutenção dos animais e experimentação possuíam luminosidade controlada com ciclo claro-escuro de 12 h (luz das 6 às 18 horas), e temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , tendo livre acesso à alimentação e água. Os animais receberam água e ração específica para roedores (Labina®-Purina) *ad libitum*.

Todos os procedimentos, aos quais os animais utilizados neste estudo foram submetidos, estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Lei Brasileira 11794 de 8/10/2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de

animais. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob o n° 30/12. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais utilizados, bem como a geração de desconforto e sofrimento.

## 4.2 ACASALAMENTO

Enquanto não estavam gestantes, as fêmeas das **categorias I e II** foram mantidas em caixas de policarbonato coletivas com dois animais por caixa. Diariamente, por no mínimo uma semana antes do acasalamento, as ratas foram submetidas à análise colpocitológica para confirmação da regularidade de seu ciclo reprodutivo (ciclo estral). Quando se encontravam na fase anterior para acasalamento (Proestro), as fêmeas foram colocadas na presença de machos (**Categoria IV**), na proporção de duas fêmeas para cada macho, sendo mantidos juntos durante a noite do Estro. Após este período, as ratas foram novamente submetidas à análise colpocitológica para a verificação da presença de espermatozóides em lâmina e, desta forma obtida a confirmação da ocorrência de cópula. Em caso positivo, este momento foi determinado como sendo o dia zero da gestação (0 DG).

## 4.3 DROGA UTILIZADA

Para a indução de HGE foi utilizado o inibidor da iodoperoxidase, MTZ (2-Mercapto-1-metilimidazol, Sigma, St. Louis, USA), administrado *ad libitum* na concentração de 0,02% na água de beber (água de torneira) a partir do nono dia de gestação (DG) até o dia do parto (SALA-ROCA *et al.*, 2002).

## 4.4 MEDIDAS E ÍNDICES CORPORAIS

### 4.4.1 Massa Corporal

A massa corporal das ratas da **categoria II** foi obtida no primeiro dia de gestação (0 DG), no nono dia de gestação (9° DG) e ao final da gestação (20°-22° DG).

A massa corporal da prole, **categoria III**, foi obtida nos períodos correspondentes a 1, 15, 23, 30, 60, 90 e 120 DPN.

#### **4.4.2 Relação peso órgão/comprimento da tibia**

A relação do peso do órgão/comprimento da tibia foi obtida nas ratas, da **categoria II**, e na prole, **categoria III**. Primeiramente, foi realizada a eutanásia, seguida por retirada do coração, fígado, pulmão, rins, gordura retroperitoneal e a tibia esquerda. Assim, o peso dos órgãos foi mensurado em balança de precisão, e por meio de um paquímetro realizou-se a medida do comprimento da tibia. A relação peso órgão/comprimento da tibia foi obtida nas ratas da **categoria II** no 21<sup>o</sup> DG e na prole, **categoria III**, aos 60, 90 e 120 DPN.

### **4.5 COMPORTAMENTO DE INGESTÃO**

#### **4.5.1 Estimativa da ingestão induzida de leite materno**

O protocolo de ingestão induzida de leite foi realizado conforme descrito por Perillan *et al.* (2004) (PERILLAN *et al.*, 2007), com algumas modificações. Aos 5 e 15 DPN, com a prole previamente ajustada com 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas), a rata foi separada da prole por duas horas, sendo que a prole recebeu marcação na cauda. Os filhotes foram pesados após as duas horas de privação, e em seguida retornaram para suas respectivas mães, por onde ficaram por mais 1h e 45 min. Após esse tempo, a prole foi novamente pesada. A estimativa da ingestão induzida de leite foi obtida pela diferença entre os pesos dos filhotes, sendo expressos em g/100 g de massa corporal do filhote (PERILLAN *et al.*, 2007).

#### **4.5.2 Comportamento da ingestão espontânea de ração, água e sódio**

Os animais da **Categoria III** foram alocados em gaiolas metabólicas individuais equipadas com comedouros e bebedouros graduados, onde tiveram livre acesso à ração, água e solução de NaCl 0,3 M.

A ração, colocada em comedouro na parte frontal da gaiola, foi pesada diariamente sempre no mesmo horário. A quantidade de ração ingerida foi calculada com base no peso da

ração do dia anterior subtraído do peso da ração do dia seguinte, sendo que as sobras que caíram no assoalho da gaiola também foram pesadas. A leitura da ingestão espontânea de ração foi realizada a cada 24 horas, impreterivelmente no mesmo horário.

A água e a solução NaCl 0,3 M ficaram disponíveis *ad libitum* em dois bebedouros de polipropileno localizados na parte frontal da gaiola. Os bebedouros, com capacidade de 100 ml, possuíam graduação a cada 1 ml, sendo vedados com rolha de borracha com bico de aço inoxidável. As leituras da ingestão espontânea de água e NaCl 0,3 M foram mensuradas a cada 24 horas, sempre no mesmo horário.

O experimento de monitoramento da quantidade de ração consumida, do volume ingerido de água e NaCl 0,3 M foi realizado nas idades 30, 60, 90 e 120 DPN. O comportamento de ingestão espontânea foi mensurado por um período de sete dias, sendo escolhido o 4<sup>o</sup> dia desse intervalo, considerando o tempo para a habituação dos animais.

#### **4.5.3 Estudo das respostas dipsogênica e natriorexigênica induzida pela depleção de sódio**

Os animais da **categoria III**, aos 120 DPN, após o período de adaptação, foram submetidos ao protocolo de depleção de sódio conforme descrito por Badauê-Passos *et al.* (2002) (BADAUE-PASSOS *et al.*, 2001).

Aproximadamente 24 horas antes do experimento, os animais foram pesados e submetidos à administração de furosemida (20 mg/kg, *via sc.*), que induz natriurese produzido pela queda do sódio renal. Nesse período os animais tiveram livre acesso à água destilada e à dieta hipossódica (fubá hidratado com água destilada). Ao final das 24 horas, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais. Sendo ofertados dois bebedouros, contendo água e NaCl 0,3 M. O volume ingerido foi mensurado em intervalos de 30 min, com duração de duas horas.

#### 4.6 MÉTODO DE EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

Os animais foram eutanasiados por método de decapitação para coleta de sangue. No dia da eutanásia, os ratos foram mantidos em ambiente diferente daquele que acontecia as decaptações, para evitar o estresse devido à presença de sangue. Para a eutanásia dos animais foi utilizada a guilhotina.

Para obtenção de soro foram coletadas amostras de sangue materno e da prole nos diferentes períodos estudados. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de polietileno (*Eppendorf*), previamente identificados, sem anticoagulante. Os tubos contendo amostras de sangue foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante armazenado a -80°C para posterior realização dos ensaios bioquímicos e hormonais.

#### 4.7 MEDIDAS DE CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE HORMÔNIOS

##### 4.7.1 Hormônios Tireoidianos

As concentrações séricas de T3 e T4 totais foram medidas por Kit comercial (Intertek, Katal, MG, Brasil) imunoenzimático competitivo (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante. O T3 apresentou sensibilidade de 0,16 ng/dL e coeficiente de variação intra-ensaio de 5,2%, sendo expressos em ng/dL. O T4 apresentou sensibilidade de 0,4 µg/dL e coeficiente de variação intra-ensaio de 4,8%, os valores foram expressos em µg/dL. As placas foram lidas a 490 nm pelo leitor de placa (Sinergy Mx, Biotek, Winooski, EUA). A concentração de hormônio final foi calculada com base numa curva padrão construída para cada teste, utilizando padrões de hormônios recombinantes. Uma vez que os valores hormonais relatados podem variar um pouco entre os fabricantes, os lotes, ou de um tipo de ensaio (por exemplo, ELISA ou RIA), todos os ensaios hormonais foram conduzidas ao mesmo tempo, a partir de fontes utilizando o mesmo kit.

#### 4.8 MEDIDAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

##### 4.8.1 Glicemia

A concentração sérica de glicose foi determinada por meio do método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase. Para tal procedimento foi utilizado o kit Glicose Enzimática (Doles Reagentes, Go/BR). Os resultados foram expressos em mg/dL

#### **4.8.2 Teste de Tolerância à Insulina Intraperitoneal (TTI)**

Os animais foram submetidos a jejum de seis horas. Para o TTI, foi injetado 0,75U/kg *ip* de insulina regular humana. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 min subsequentes (YUAN *et al.*, 2011). A glicose sanguínea foi mensurada utilizando-se glicosímetro (Accu-check / Roche). Os valores de glicemia foram expressos em mg/dL.

#### **4.8.3 Teste de Tolerância à Glicose Intraperitoneal (TTG)**

Após 48 horas do TTI, a glicose foi mensurada novamente. Foi administrada glicose, a 50%, *ip.*, na proporção de 1mg de glicose por grama de peso do animal. A glicemia foi mensurada novamente nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 min pós-injeção (YUAN *et al.*, 2011). A glicose sanguínea foi mensurada utilizando-se glicosímetro (Accu-check / Roche). Os valores foram expressos em mg/dL.

#### **4.8.4 Colesterol e Triacilglicerol**

As concentrações séricas de colesterol total, fração HDL-colesterol e triglicerídeos (TGL) foram mensuradas por método enzimático colorimétrico (Doles Reagentes). A fração LDL-colesterol foi calculada de acordo com a equação de Friedwald *et al.*, (1972) (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972):

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - (\text{Triglicérides}/5)$$

Enquanto que a fração VLDL-colesterol foi obtida pela fórmula:

$$\text{VLDL} = \text{Triglicérides}/5$$

#### 4.8.5 Ureia

A ureia sérica foi mensurada por método enzimático colorimétrico (Doles Reagentes). Os resultados foram expressos em mg/dL.

#### 4.8.6 Hematócrito

O hematócrito foi determinado por meio da centrifugação de amostra de sangue em tubo capilar. A leitura da percentagem de hematócrito foi realizada por meio de uma escala graduada.

### 4.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

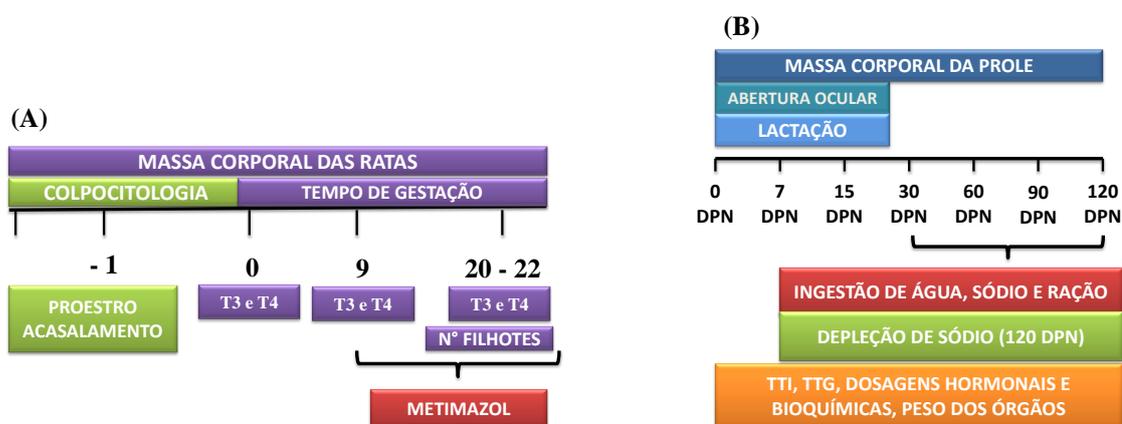
Os experimentos seguiram o seguinte cronograma experimental:

**Categoria I:** 1. Dez fêmeas foram acompanhadas para detecção do proestro e acasalamento com os ratos da **categoria IV**. 2. As fêmeas prenhas foram utilizadas para dosagens hormonais (T3 e T4) e retirada dos órgãos. 3. No 1° dia de gestação cinco ratas foram decapitadas. 4. A partir do 9° DG, cinco ratas receberam solução contendo MTZ 0,02% na água de beber até o dia do parto. 5. No 21° DG, cinco ratas foram decapitadas e retirado os órgãos.

**Categoria II:** 1. As fêmeas foram acompanhadas para detecção do proestro e acasalamento com os ratos da **categoria IV**. 2. No 9° dia de gestação 15 ratas foram submetidas ao protocolo de indução do HGE (MH) e 15 ratas receberam veículo (ME). 3. No dia do parto, foi interrompida a administração de MTZ. 4. A prole dessas ratas formou a **categoria III**.

**Categoria III:** Essa categoria foi dividida em três grupos experimentais, **grupo III-1, grupo III-2 e grupo III-3**. O **grupo III-1**, composto por machos e fêmeas da PME e da PMH, foi utilizado para dosagens hormonais nos períodos 15 e 30 DPN. O **grupo III-2** foi utilizado aos 15, 30, 60, 90 e 120 DPN para dosagem bioquímica e retirada dos órgãos. Esse grupo foi composto por ratos PMH e PME (machos e fêmeas). O **grupo III-3**, composto por machos PME e machos PMH, foi utilizado para mensuração da ingestão de ração, água e NaCl 0,3 M.

Sete dias antes de completarem 30, 60, 90 e 120 DPN, os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas. Ao final do experimento de ingestão espontânea, aos 120 DPN, os mesmos animais foram utilizados para os experimentos de depleção de sódio e TTG e TTI. Todos os subgrupos utilizados neste estudo foram compostos por 10 animais.



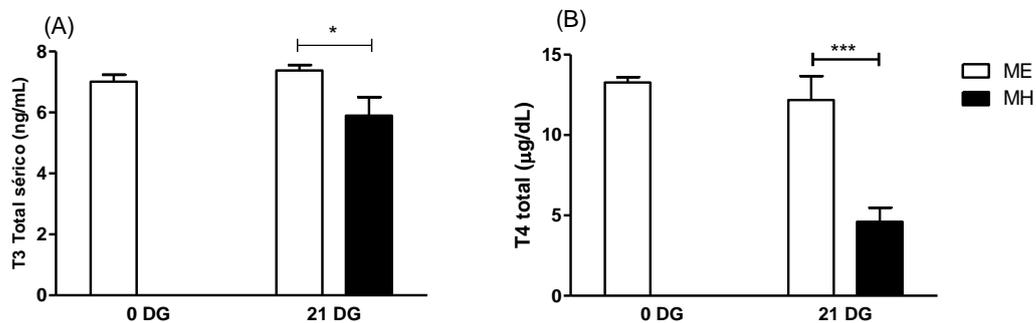
**Figura 1.** Procedimento experimental adotado nas mães (Painel A) e na prole (Painel B).

#### 4.10 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados obtidos foram expressos em valores de média e erro padrão da média. Mais de dois grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação foram analisados por ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. Quando houve mais de dois grupos submetidos à interferência simultânea de três fatores de variação foram analisados por ANOVA de três vias, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para comparações entre dois grupos com um único fator de variação, utilizou-se o teste *t* de *Student*. O nível crítico fixado foi de 5% ( $P < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de médias como estatisticamente significante. Para realização dos testes estatísticos foram utilizados os programas Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, USA).

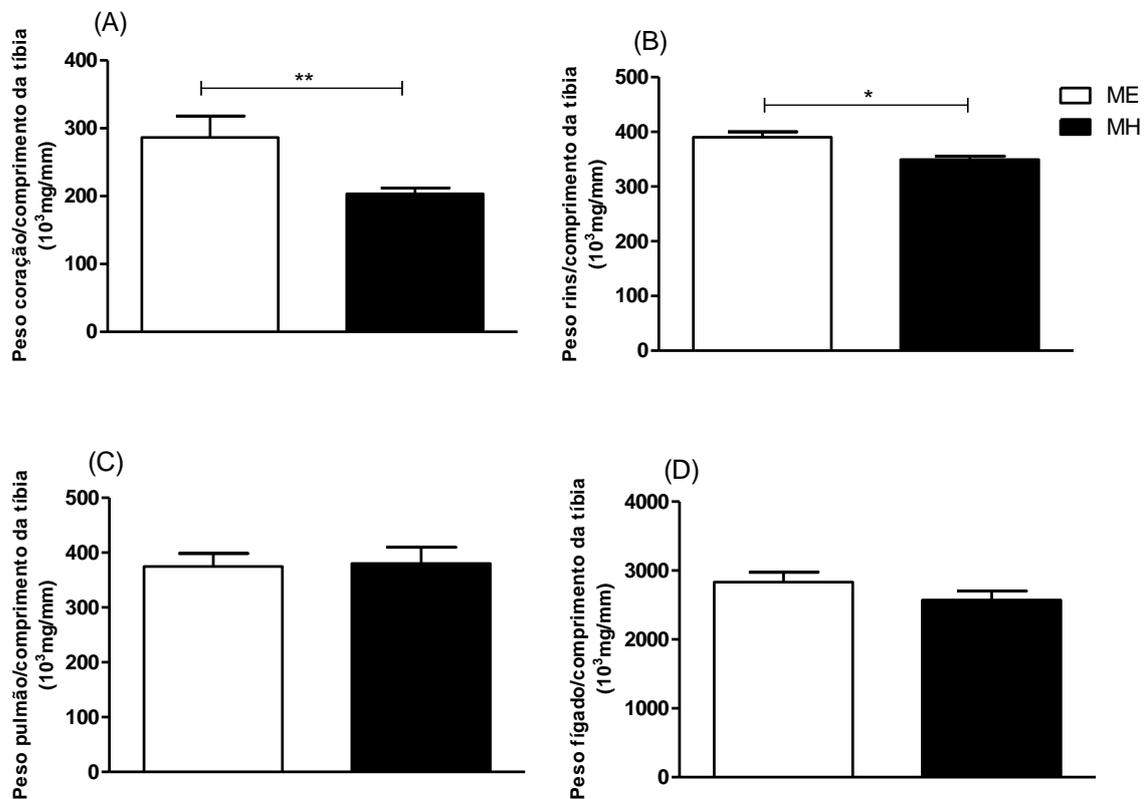
## 5 RESULTADOS

A administração oral *ad libitum* de MTZ do 9° DG ao 21° DG reduziu as concentrações séricas de T3 ( $7,4 \pm 0,2$  versus  $5,9 \pm 0,6$  ng/mL,  $p < 0,05$ , ao 21° DG, Fig. 2A) e de T4 totais ( $12,2 \pm 1,5$  versus  $4,6 \pm 0,9$  µg/dL,  $p < 0,001$ , ao 21° DG, Fig. 2B) no grupo MH quando comparado ao grupo ME (Para T3: efeito da interação,  $F_{(1, 18)} = 4,892$ ;  $p = 0,04$ ; tratamento,  $F_{(1, 18)} = 4,892$ ;  $p = 0,042$ ; e para T4: efeito do tratamento,  $F_{(1, 18)} = 21,41$ ;  $p = 0,0002$ ; efeito do tempo,  $F_{(1, 18)} = 35,31$ ;  $p < 0,0001$ ; efeito da interação,  $F_{(1, 18)} = 21,41$ ;  $p = 0,0002$ ).



**Figura 2.** Efeito do tratamento com metimazol do 9° DG ao 21° DG nas concentrações séricas de T3 (Painel A) e T4 totais (Painel B) das ratas prenhas. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. DG: dia de gestação; ME: mães eutireoideanas, n=5; MH: mães hipotireoideanas, n=5). (\*)  $p < 0,05$  ou (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle.

Conforme demonstrado na figura 3, o tratamento utilizado para indução do hipotireoidismo promoveu redução significativa no peso relativo do coração ( $203,6 \pm 8,55$  versus  $254,85 \pm 6,34$   $10^3$ g/mm,  $p = 0,0065$ ; Painel A) e dos rins ( $349,42 \pm 5,8$  versus  $390 \pm 10$   $10^3$ g/mm,  $p = 0,0127$ ; Painel B) das mães hipotireoidenas, no período correspondente ao 21° DG. O mesmo, no entanto, não foi verificado para o pulmão e o fígado (Painéis C e D).



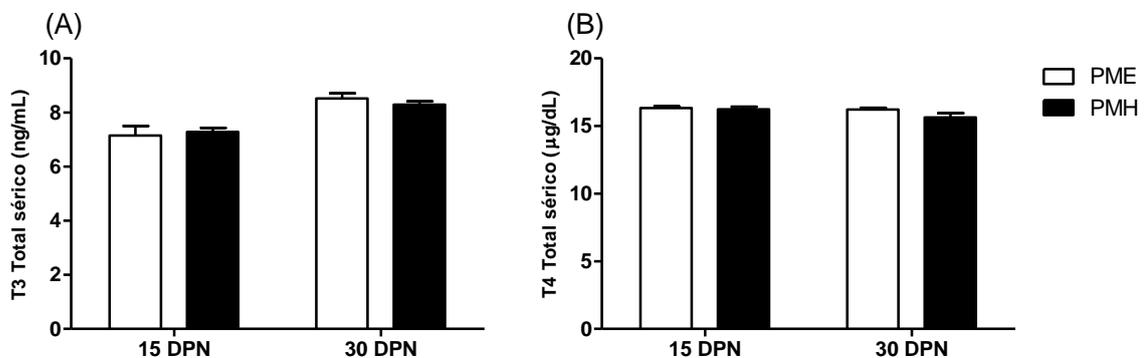
**Figura 3.** Efeito do HGE nos pesos dos órgãos normalizados pelo comprimento da tíbia das ratas prenhas. Estão representados o coração (A), rins (B), pulmão (C) e fígado (D) no 21<sup>o</sup> DG. Análise estatística: Teste t de *Student*. (\*)  $p < 0,05$  ou (\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao grupo ME. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; ME: mães eutireoideanas,  $n=4$ ; MH: mães hipotireoideanas,  $n=4$ .

O tempo de gestação foi significativamente elevado nas mães hipotireoideanas (MH) quando comparadas às mães eutireoideanas (ME) ( $22,52 \pm 0,12$  versus  $21,23 \pm 0,12$  dias,  $p < 0,0001$ ). No entanto, não foram identificadas diferenças no número de filhotes por ninhada, bem como na massa corporal aos 0, 9<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> DG das ratas tratadas com MTZ quando comparadas as ratas eutireoideanas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do HGE no tempo de gestação, número de filhotes por rata e na massa corporal das mães nos dias 0, 9 e 21 de gestação. Análise estatística: Teste t de *Student*. (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , em comparação ao grupo ME. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; ME: mães eutireoideanas; MH: mães hipotireoideanas; DG: dia de gestação.

Grupos	Dias de gestação	Número de filhotes por rata	Massa corporal (g) no 0 DG	Massa corporal (g) no 9º DG	Massa corporal (g) no 21º DG
ME	21,23 ± 0,12 (n=13)	9,53 ± 0,80 (n=17)	215,33 ± 5,02 (n=9)	246,01 ± 6,89 (n=8)	316,79 ± 7,96 (n=9)
MH	22,52 ± 0,12*** (n=17)	9,53 ± 0,65 (n=17)	208,66 ± 5,88 (n=13)	238,41 ± 5,95 (n=13)	316,08 ± 8,95 (n=13)

Na Figura 4, observa-se que a PMH não apresentou alteração nas concentrações séricas de T3 total (Painel A) e T4 total (Painel B) aos 15 e 30 DPN, quando comparados à PME. A análise de variância de duas vias revelou haver elevação significativa do T3 total em função do tempo ( $F_{(1, 24)} = 28,77$ ;  $p < 0,0001$ ), mas não em função do fator tratamento. Ademais, demonstrou não haver interação destes fatores.

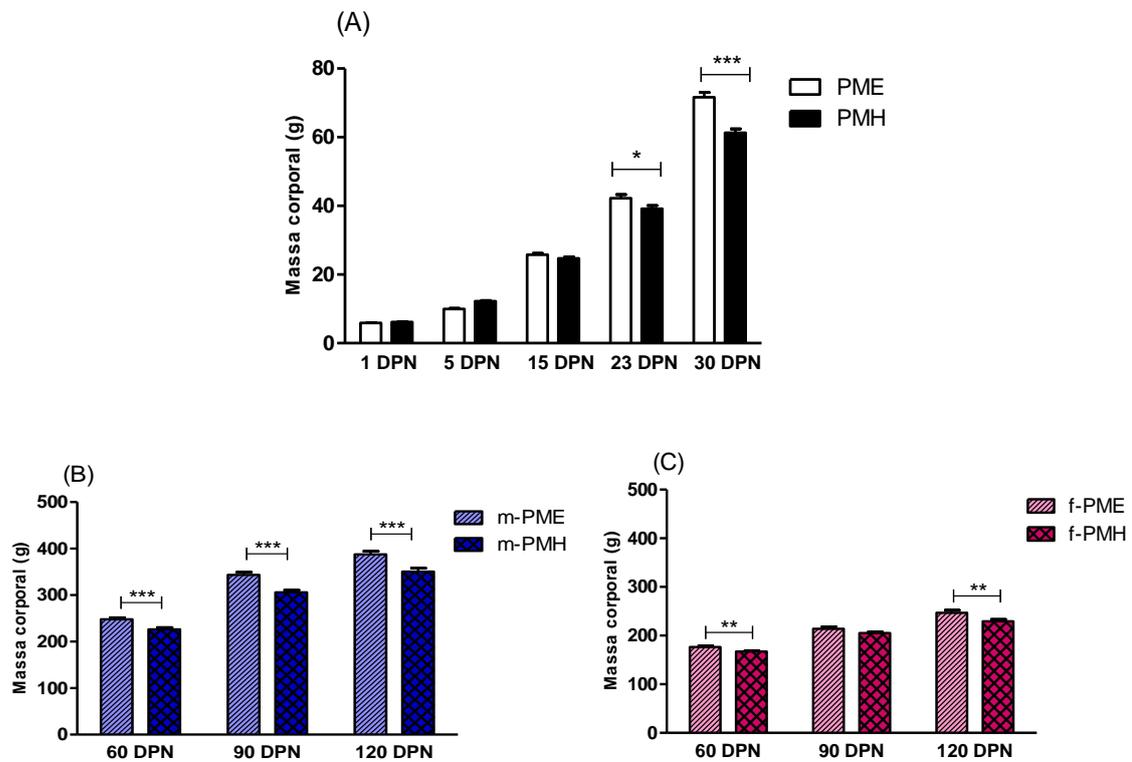


**Figura 4.** Efeito do HGE nas concentrações séricas de T3 (Painel A) e T4 totais (Painel B) da PME e PMH. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal; PME: prole de mães eutireoideanas, n=10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10.

A avaliação da influência do HGE na evolução da massa corporal da prole não evidenciou diferenças entre os grupos PMH e PME ao 1º, 5º e 15º DPN (5, 88±0,07 *versus*

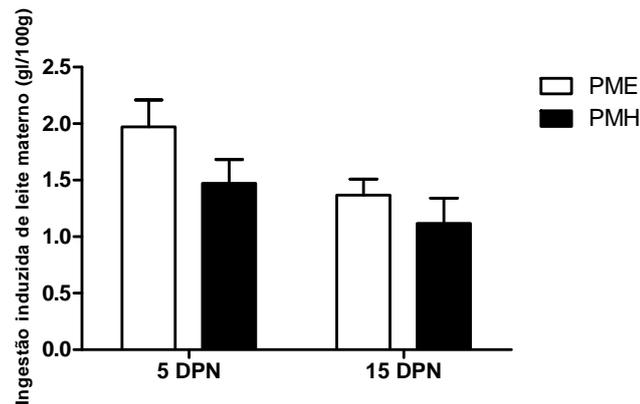
6,2±0,07 g, 9,97±0,2 *versus* 12,25±0,2 g, 25,74±0,4 *versus* 24,67±0,41 g, respectivamente) (Fig. 5A). No entanto, ao 23° e 30° DPN, a prole de mães hipotireoideanas apresentou-se significativamente menor massa corporal quando comparada à prole de mães eutireoideanas (42,22±1,07 *versus* 39,14±0,97 g,  $p < 0,05$ , 71,66±1,38 *versus* 61,29±1,18 g,  $p < 0,001$ , respectivamente) (efeito da interação:  $F_{(4, 301)} = 210,2$ ;  $p < 0,001$ ; do tratamento:  $F_{(1, 301)} = 25,7$ ;  $p < 0,0001$ ; do tempo:  $F_{(4, 301)} = 2234,7$ ;  $p < 0,0001$ ) (Fig. 5A).

Aos 60, 90 e 120 DPN realizou-se o teste estatístico de ANOVA de três vias, no entanto não foi verificada interação dos fatores estudados ( $p = 0,326$ ). Assim, realizou-se a análise de variância de duas vias, separando os grupos de acordo com o gênero. A massa corporal dos machos sofreu efeito do tratamento ( $F_{(1,122)} = 45,35$ ,  $p < 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(2, 122)} = 318,8$ ,  $p < 0,0001$ ), porém não se observou interação desses fatores. Os m-PMH apresentaram menor massa corporal, quando comparados aos m-PME, em todos os tempos avaliados (226,6±3,8 *versus* 248,1±3,9 g,  $p < 0,001$ ; 305,84±4,7 *versus* 343,5±6 g,  $p < 0,001$ ; 350,7±7,6 *versus* 387,7±6,9 g,  $p < 0,01$ ) (Fig. 5B). Em relação às fêmeas, verificou-se efeito do tratamento ( $F_{(1, 115)} = 17,2$ ,  $p < 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(2, 115)} = 198,8$ ,  $p < 0,0001$ ), porém, novamente não houve interação dos fatores avaliados. Nesta análise, as fêmeas PMH apresentaram menor massa corporal, quando comparadas às f-PME, aos 60 e 120 DPN (167,5±1,9 *versus* 176,4±2,5 g,  $p < 0,01$ ; 229,5±3,9 *versus* 246,9±5,4 g,  $p < 0,01$ ), em todos os tempos avaliados (Fig. 5C).



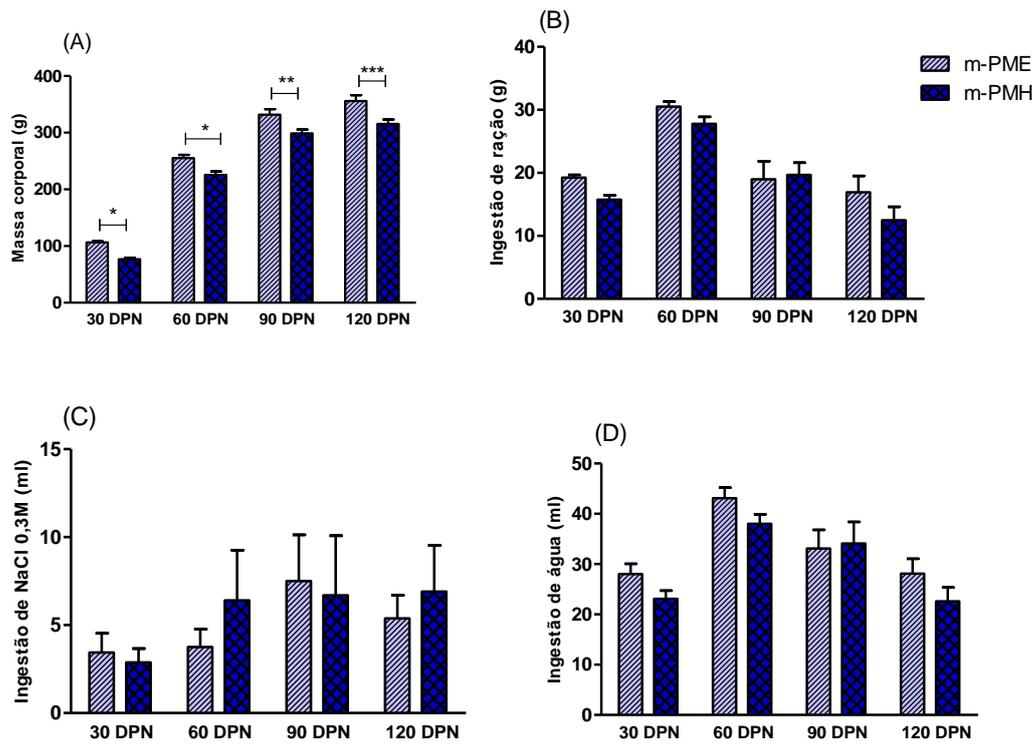
**Figura 5.** Efeito do HGE na massa corporal da prole. Painel A: PME: prole de mães eutireoideanas, n= 36, 27, 27, 31, 30, respectivamente; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=42, 30, 28, 31, 29, respectivamente. Painel B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=36, 22, 9; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=31, 21, 9. Painel C: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=31, 22, 9; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=29, 20, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal

A ingestão induzida de leite materno (g/100g) não diferiu entre os grupos PME e PMH (Fig. 6). A análise de variância de duas vias não revelou haver interação dos fatores tratamento e tempo e do fator tratamento isoladamente. Apenas houve tendência à significância do fator tempo ( $F_{(1, 141)} = 3,24$ ,  $p = 0,074$ ).



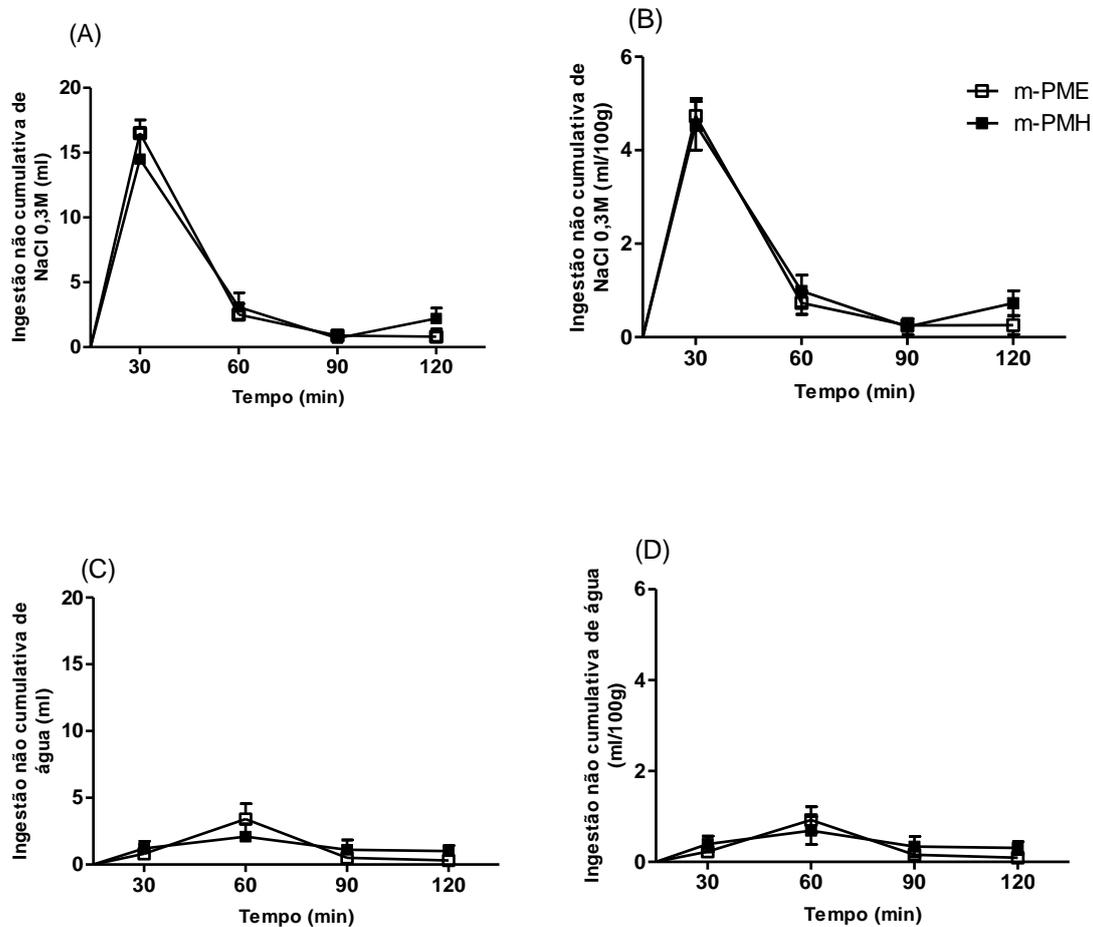
**Figura 6.** Efeito do HGE na ingestão induzida de leite materno na prole aos 5 e 15 DPN. PME: prole de mães eutireoideanas, n= 52 (5 DPN) e n=20 (15 DPN); PMH: prole de mães hipotireoideanas, n= 52 (5 DPN) e n=21 (15 DPN). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Em todos os tempos avaliados (30, 60, 90 e 120 DPN), os machos PMH apresentaram menor massa corporal, quando comparados aos machos PME (Fig. 7A). A análise de variância de duas vias revelou haver redução significativa da massa corporal em função do fator tratamento ( $F_{(1, 51)} = 19,35$ ,  $p = 0,0004$ ) e em função do fator tempo ( $F_{(3, 51)} = 853,4$ ;  $p < 0,0001$ ). No entanto, não houve interação entre esses fatores. O pós-teste de Bonferroni evidenciou menor massa corporal dos m-PMH aos 30 ( $76,91 \pm 2,70$  versus  $106,45 \pm 2,16$  g,  $p < 0,05$ ), 60 ( $225,64 \pm 5,84$  versus  $255,10 \pm 5,75$  g,  $p < 0,05$ ), 90 ( $298,89 \pm 6,78$  versus  $331,94 \pm 9,73$  g,  $p < 0,01$ ) e 120 DPN ( $315,41 \pm 7,9$  versus  $355,9 \pm 10,26$  g,  $p < 0,001$ ), quando comparados aos m-PME. Quanto aos valores de ingestão espontânea de ração, NaCl 0,3 M e água, estão representados, em valores absolutos, na Figura 6 (Painéis B a D). Essas variáveis foram submetidas à análise de variância de duas vias, e não foi evidenciado interação dos fatores tratamento e tempo, e também não houve efeito significativo do tratamento, isoladamente. Ademais, essa mesma análise evidenciou efeito significativo do fator tempo (para ração:  $F_{(3, 51)} = 29,21$ ,  $p < 0,0001$ ; para água:  $F_{(3, 51)} = 16,01$ ,  $p < 0,0001$ ). A exceção aconteceu para a ingestão de sódio, que não se evidenciou efeito do tempo.



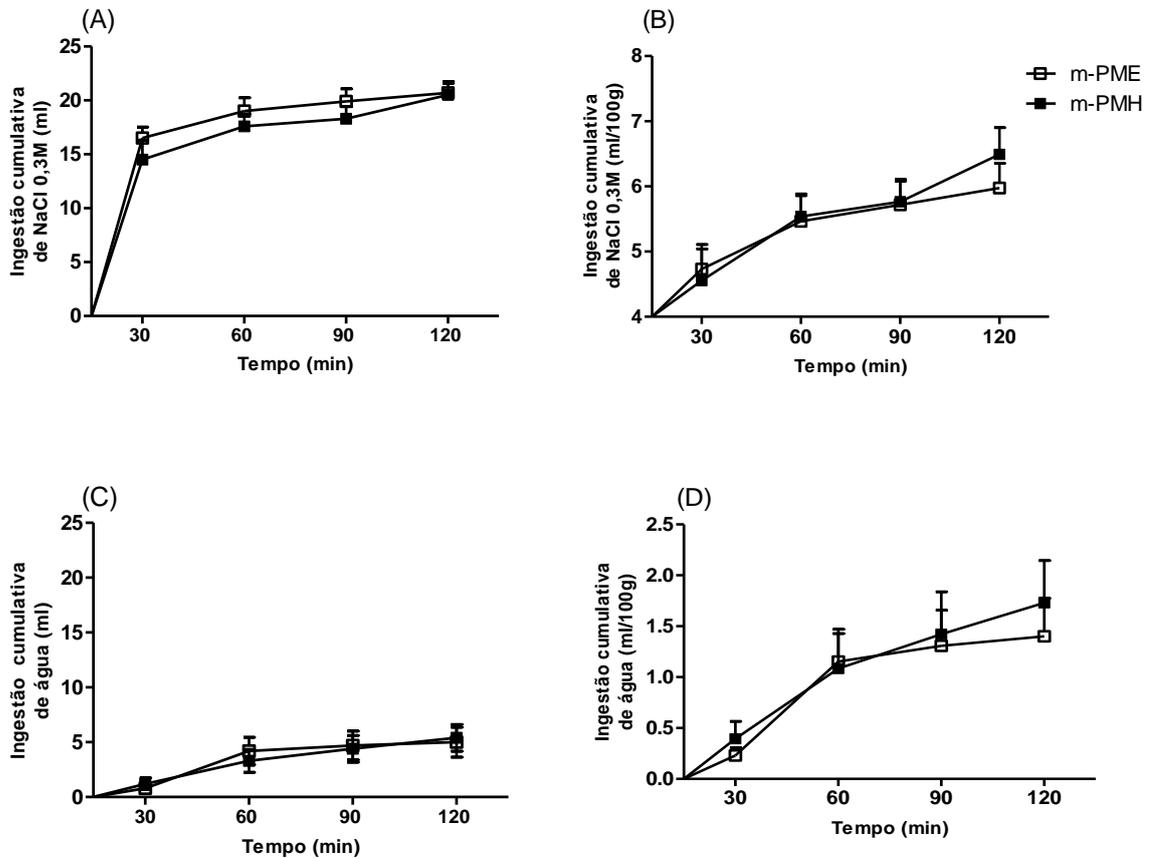
**Figura 7.** Efeito do HGE na massa corporal (Painel A) e no comportamento de ingestão espontânea de ração, NaCl 0,3 M e água (Painéis B a D) em machos da prole de mães hipotireoideanas (m-PMH, n=10) e eutireoideanas (m-PME, n=10). O consumo de ração e o volume ingerido de NaCl 0,3 M e água estão expressos em valores absolutos (Painéis B, C e D). (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  ou (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni.

Os valores de ingestão induzida e não cumulativa de NaCl 0,3 M e água, 24 h após a administração de Furosemida nos animais dos grupos experimentais PME e PMH estão expressos na figura 8. Após análise, observou-se que os fatores estudados não interagem, e ainda que o fator tratamento também não afeta as variáveis expressas na figura 8. Porém, observou-se que estas mesmas variáveis sofrem influência do fator tempo (para água:  $F_{(3, 72)} = 4,41$ ,  $p = 0,007$ ; para água/100g:  $F_{(3, 72)} = 4,22$ ,  $p = 0,008$ ; para sódio:  $F_{(3, 72)} = 100,7$ ,  $p < 0,0001$ ; para sódio/100g:  $F_{(3, 72)} = 93,9$ ,  $p < 0,0001$ ).



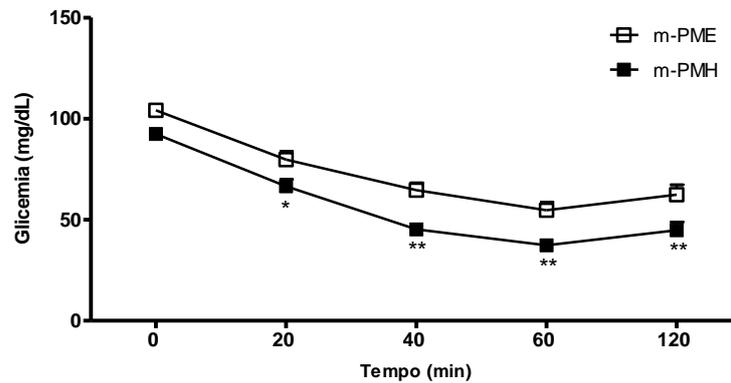
**Figura 8.** Efeito do HGE no comportamento de ingestão não cumulativa de NaCl 0,3 M (Painéis A e B) e água (Painéis C e D) em machos da prole de mães hipotireoideanas (m-PMH, n=10) e eutireoidianas (m-PME, n=10) depletados de sódio. Os volumes ingeridos estão expressos em valores absolutos (Painéis A e C) ou normalizados por 100g de massa corporal (Painéis B e D). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Quanto à ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água, 24 h após indução de depleção de sódio, os animais dos grupos experimentais PME e PMH não apresentaram diferenças nos volumes ingeridos, tanto absolutos quanto normalizados (Fig. 9). A análise de variância de duas vias revelou que os fatores estudados não interagem, ademais, o fator tratamento também não afeta as variáveis expressas na figura 7. Contudo, essas variáveis sofrem a influência do fator tempo (para água:  $F_{(3, 72)} = 5,68$ ,  $p = 0,0015$ ; para água/100g:  $F_{(3, 72)} = 5,64$ ,  $p = 0,0016$ ; para sódio:  $F_{(3, 72)} = 6,06$ ,  $p = 0,001$ ; para sódio/100g:  $F_{(3, 72)} = 5,7$ ,  $p = 0,0015$ ).



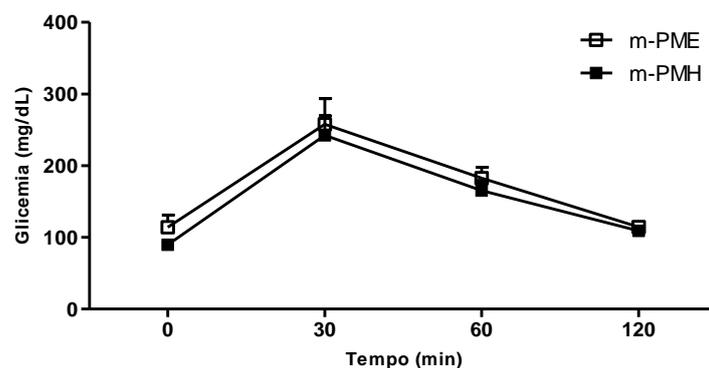
**Figura 9.** Efeito do HGE no comportamento de ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (Painéis A e B) e água (Painéis C e D) em machos da prole de mães hipotireoideanas (m-PMH, n=10) e eutireoidianas (m-PME, n=10) depletados de sódio. Os volumes ingeridos estão expressos em valores absolutos (Painéis A e C) ou normalizados por 100g de massa corporal (Painéis B e D). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Aos 120 DPN, os machos foram submetidos ao TTI (Fig. 10). De acordo com a análise de variância de duas vias, verificou-se, para o TTI, efeito fortemente significativo do tratamento ( $F_{(1,70)} = 51,042$ ,  $p < 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(4, 70)} = 71,377$ ,  $p < 0,0001$ ). Entretanto, não houve interação dos fatores tempo e tratamento. Com exceção do tempo zero, nos demais tempos avaliados, a glicemia dos m-PMH foi sempre menor (aos 20 min:  $66,5 \pm 3,43$  versus  $79,75 \pm 4,03$  mg/dL,  $p < 0,05$ ; aos 40 min:  $45,25 \pm 2,43$  versus  $64,63 \pm 3,58$  mg/dL,  $p < 0,01$ ; aos 60 min:  $37,38 \pm 2,13$  versus  $54,75 \pm 3,96$  mg/dL,  $p < 0,001$ ; aos 120 min:  $44,75 \pm 4,13$  versus  $63,38 \pm 4,92$  mg/dL,  $p < 0,01$ ), quando comparados aos m-PME.



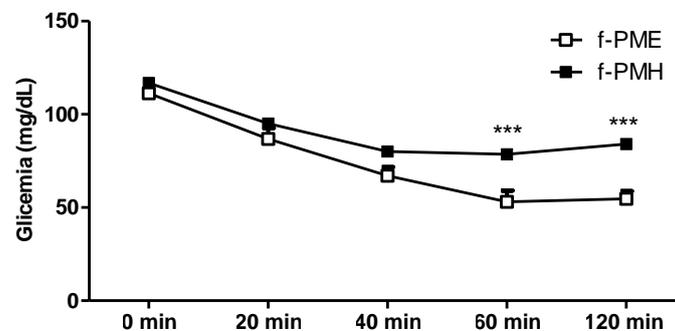
**Figura 10.** Efeito do HGE no Teste de Tolerância à Insulina (TTI) da prole aos 120 DPN. m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas (n=8); m-PMH: machos prole de mães hipotireoideanas (n=8). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Quando os machos PMH e PME foram submetidos à injeção de glicose intraperitoneal (i.e. TTG), a glicemia não diferiu entre os grupos (Fig. 11). Isto foi demonstrado após a análise de variância de duas vias, que não evidenciou interação significativa dos fatores tempo e tratamento, e tampouco o efeito do fator tratamento isoladamente. Apenas o fator tempo ( $F_{(3, 35)} = 30,388$ ,  $p < 0,0001$ ) mostrou-se afetar significativamente a glicemia de ambos os grupos.



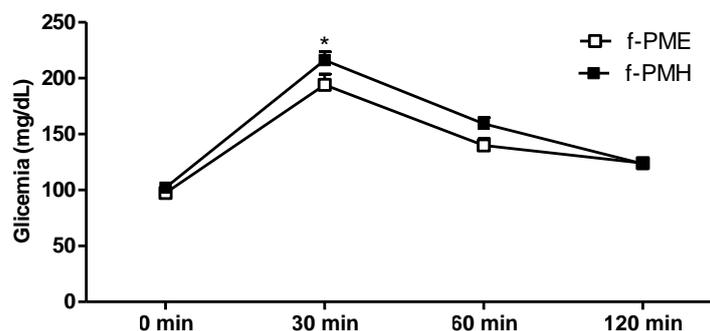
**Figura 11.** Efeito do HGE no Teste de Tolerância à Glicose (TTG) da prole aos 120 DPN. m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas (n=4); m-PMH: machos prole de mães hipotireoideanas (n=6). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Aos 120 DPN, as fêmeas PME e PMH, foram submetidas ao TTI (Fig. 12). A análise de variância da glicemia do TTI revelou um efeito significativo da interação ( $F_{(4, 70)} = 3,049$ ,  $p = 0,0224$ ), do tratamento ( $F_{(1,70)} = 36,24$ ,  $p = 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(4, 70)} = 43,22$ ,  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni evidenciou que nos tempos 60 ( $78,6 \pm 4,55$  versus  $53 \pm 6,1$  mg/dL,  $p < 0,001$ ) e 120 minutos ( $84,1 \pm 5,26$  versus  $54,67 \pm 4,19$ ,  $p < 0,001$ ) pós-administração de insulina, a glicemia foi maior no grupo f-PMH, quando comparado ao grupo f-PME.



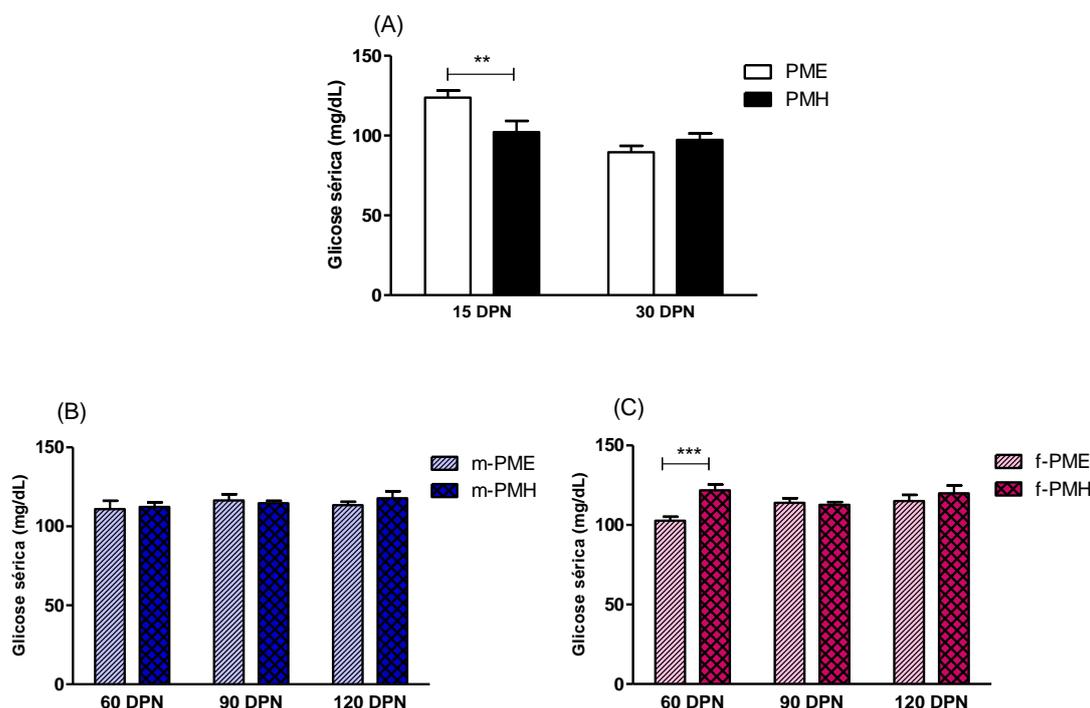
**Figura 12.** Efeito do HGE no TTI na prole aos 120 DPN. f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas (n=6); f-PMH: fêmeas prole de mães hipotireoideanas (n=10). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Na figura 13 está representada a glicemia das fêmeas após o TTG. A análise de variância de duas vias revelou ausência de interação, porém com efeito significativo do tratamento ( $F_{(1, 56)} = 8,1185$ ,  $p = 0,0061$ ) e do tempo ( $F_{(3, 56)} = 129,832$ ,  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni indicou que aos 30 min pós-administração de glicose, as fêmeas PMH apresentaram glicemia significativamente maior ( $216,11 \pm 7,62$  versus  $194,14 \pm 9,49$  mg/dL,  $p < 0,01$ ), quando comparadas às f-PME.



**Figura 13.** Efeito do HGE no Teste de Tolerância à Glicose (TTG) na prole aos 120 DPN. f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas (n=7); f-PMH: fêmeas prole de mães hipotireoideanas (n=9). Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*)  $p < 0,05$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

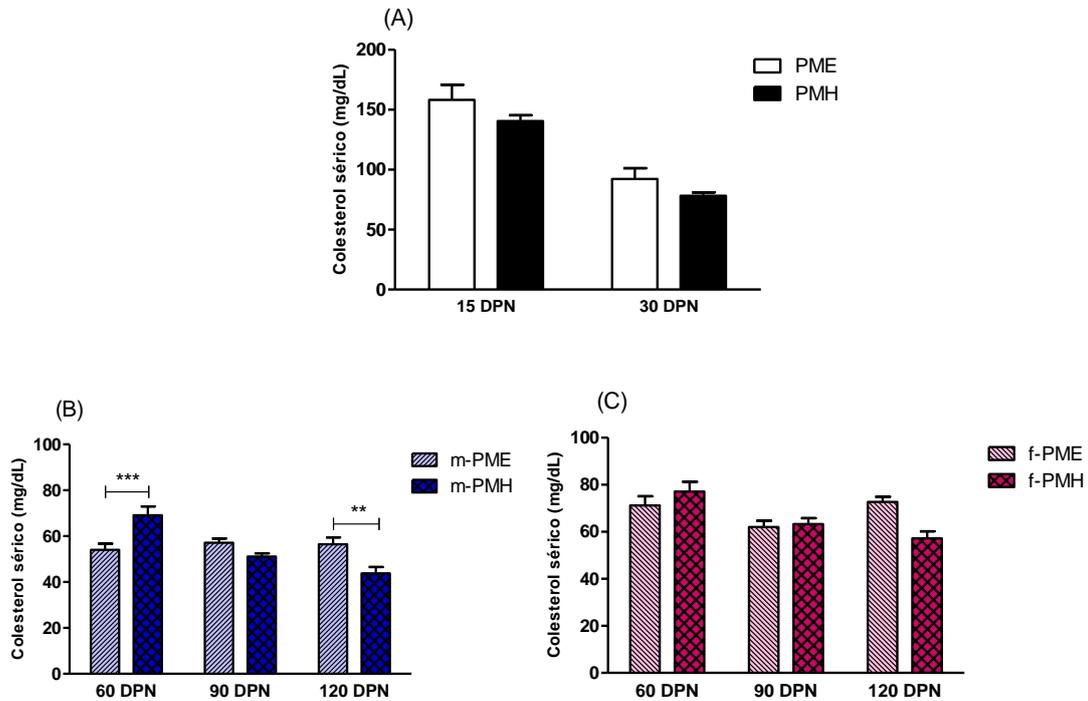
A figura 14 apresenta a glicemia de jejum, em diferentes idades, da PMH e PME. Após a análise de variância de duas vias, verificou-se, aos 15 DPN, redução significativa da glicemia em função do tempo ( $F_{(1, 18)} = 12,7723$ ,  $p < 0,0022$ ), independentemente do fator tratamento. Adicionalmente, houve interação entre o tratamento e o tempo ( $F_{(1, 18)} = 7,1323$ ,  $p < 0,0156$ ). O pós-teste de Bonferroni evidenciou menor glicemia da PMH aos 15 DPN ( $102,11 \pm 6,99$  versus  $123,82 \pm 4,38$  mg/dL,  $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo PME (Painel A). Ao analisar os grupos PME e PMH, de ambos os gêneros, aos 60, 90 e 120 DPN, pelo teste de variância de três vias, não foi verificada interação dos fatores estudados (i.e. tratamento, tempo e gênero;  $p = 0,136$ ). Assim, separou-se os grupos PME e PMH, de acordo com o gênero. Ainda assim, em machos, nenhuma diferença foi constatada para os fatores tempo, tratamento e interação (Painel B). Na glicemia das f-PMH, a análise de variância de duas vias revelou efeito significativo da interação ( $F_{(2, 54)} = 4,716$ ,  $p = 0,013$ ) e do fator tratamento ( $F_{(1, 54)} = 7,50$ ,  $p = 0,008$ ). O pós-teste de Bonferroni indicou maior glicemia das f-PMH aos 60 DPN ( $121,8 \pm 3,58$  versus  $102,72 \pm 2,45$  mg/dL,  $p < 0,001$ ).



**Figura 14.** Efeito do HGE na concentração sérica de Glicose na prole. Painei A: PME: prole de mães eutireoideanas, n=10, 10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10; Painei B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10; Painei C: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*\*\*)  $p < 0,001$  ou (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

A concentração sérica de colesterol, em diferentes idades, está representada na figura 15. A análise de variância de duas vias revelou haver redução significativa da colesterolemia em função do tempo ( $F_{(1, 18)} = 77,783$ ,  $p < 0,0001$ ), aos 15 e 30 DPN (Painei A), independentemente do fator tratamento. Ao analisar a concentração de colesterol sérico em função dos fatores tratamento, gênero e tempo, não se verificou diferença entre os grupos ( $p = 0,141$ ). Desse modo, separou-se os grupos de acordo com o gênero. Nos machos, a análise de variância de duas vias, revelou haver efeito significativo da interação ( $F_{(2, 54)} = 14,63$ ,  $p < 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(2, 54)} = 9,35$ ,  $p = 0,0003$ ). O pós-teste de Bonferroni evidenciou que o colesterol dos m-PMH foi maior que os m-PME aos 60 DPN ( $69,2 \pm 3,8 \pm 3,8$  versus  $54 \pm 2,7 \pm 2,66$  mg/dL,  $p < 0,001$ ) e menor aos 120 DPN ( $43,8 \pm 2,7 \pm 2,72$  versus  $56,5 \pm 3 \pm 2,96$  mg/dL,  $p < 0,01$ ) (Painei B). A análise do colesterol sérico nas fêmeas PME e PMH evidenciou efeito significativo da interação ( $F_{(2, 53)} = 6,372$ ,  $p = 0,0034$ ), e do fator tempo ( $F_{(2, 53)} = 7,399$ ,  $p = 0,0015$ ) sem efeito significativo do fator tratamento. O pós-teste de

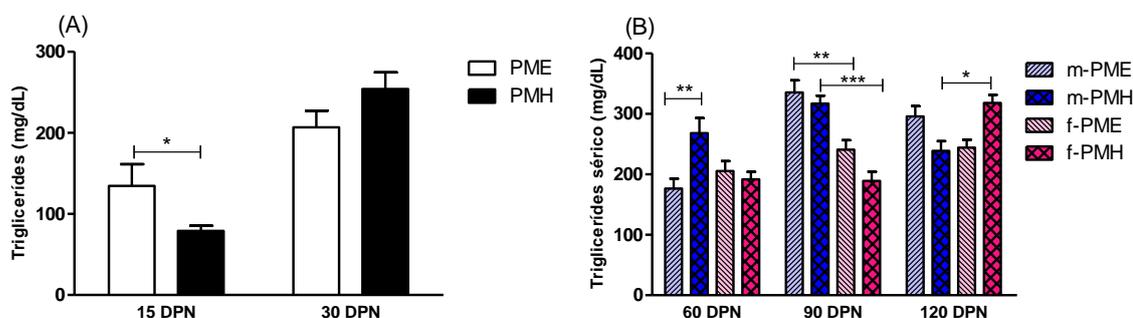
Bonferroni evidenciou diferença aos 120 DPN, em que as f-PMH possuíam menor colesterol que o grupo controle ( $57,21 \pm 3,9 \pm 2,98$  versus  $72,68 \pm 2,16$  mg/dL,  $p < 0,01$ ) (Painel C).



**Figura 15.** Efeito do HGE na concentração sérica de Colesterol da prole. Painel A: PME: prole de mães eutireoideanas, n=10, 10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10; Painel B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10; Painel C: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*\*\*)  $p < 0,001$  ou (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

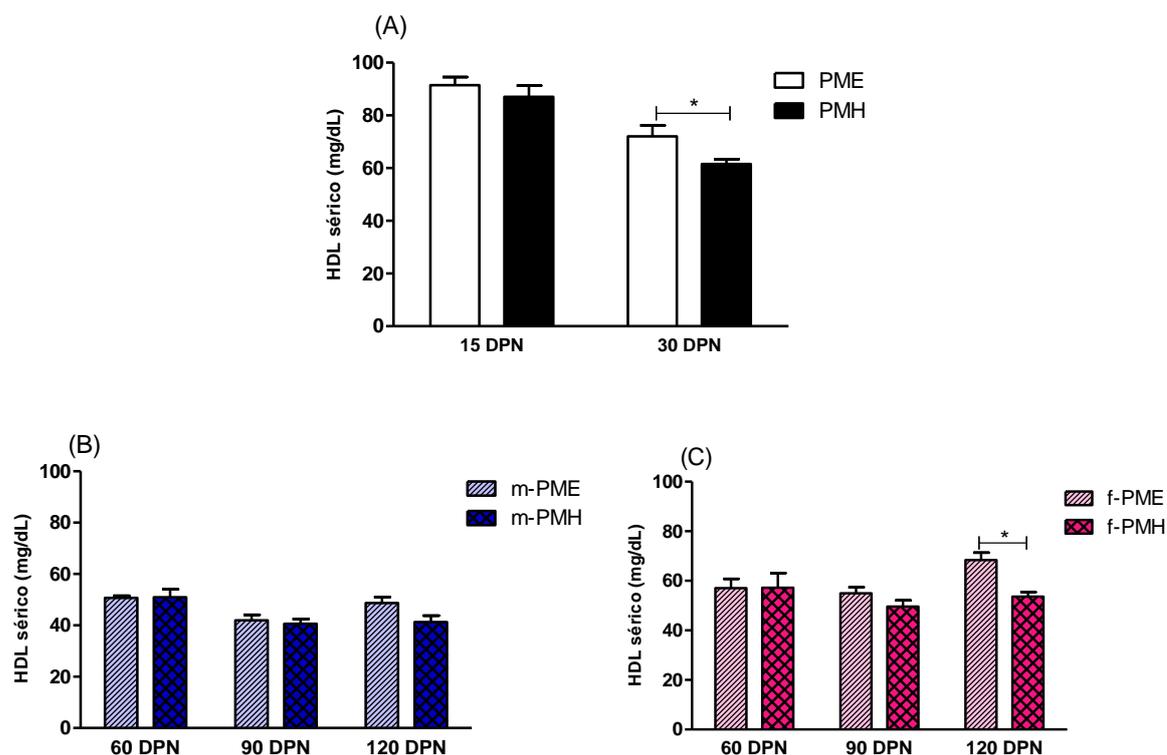
A concentração sérica de TGL, aos 15 e 30 DPN, sofreu influência interativa dos fatores tempo e tratamento ( $F_{(1, 34)} = 40,86$   $p = 0,012$ ), bem como do fator tempo, isoladamente ( $F_{(1, 34)} = 40,86$ ,  $p < 0,0001$ ) (Fig.16 A). Sendo que o pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa aos 15 DPN, em que o grupo PMH apresentou menor concentração de TGL ( $79,1 \pm 6,3$  versus  $117,7 \pm 24$  mg/dL,  $p = 0,039$ ), quando comparado ao grupo controle. Ao avaliar a concentração de TGL aos 60, 90 e 120 DPN, por meio do teste estatístico ANOVA de três vias, evidenciou-se efeito significativo da interação tripla dos fatores tratamento, gênero e tempo ( $F_{(2, 120)} = 13,49$ ,  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni

evidenciou que o TGL dos m-PMH foi significativamente maior aos 60 DPN ( $268,08 \pm 25,13$  versus  $176,4 \pm 16,29$ ,  $p < 0,01$ ), quando comparado aos m-PME (Painel B).



**Figura 16.** Efeito do HGE na concentração sérica de triglicérides da prole. Painel A: PME: prole de mães eutireoideanas, n=10, 10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10; Painel B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10; f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni (Painel A) e ANOVA de três vias seguido do pós-teste de Bonferroni (Painel B); (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

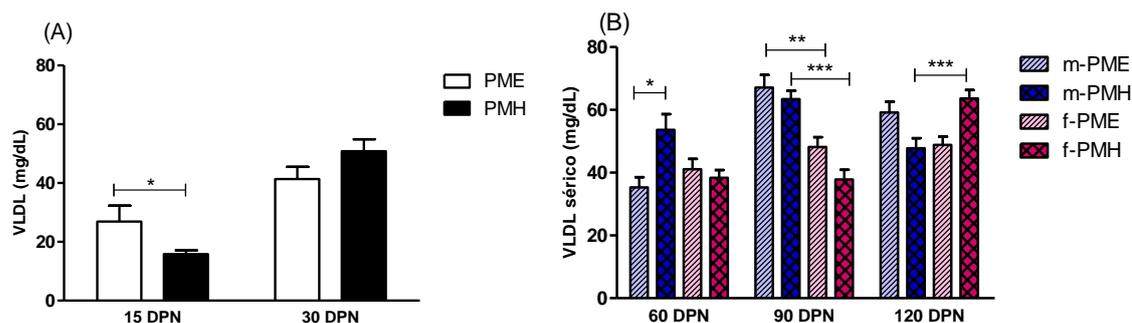
A figura 17 representa a concentração sérica de HDL em diferentes idades das proles. A análise de variância da concentração sérica de HDL, aos 15 e 30 DPN, revelou haver influência significativa do fator tratamento ( $F_{(1, 36)} = 4,55$ ,  $p = 0,0398$ ). Da mesma forma, o fator tempo também afetou a variável HDL ( $F_{(1, 36)} = 41,26$ ,  $p < 0,0001$ ) (Painel A). Isto foi reiterado após o teste de Bonferroni, que indicou menor concentração sérica na PMH aos 30 DPN ( $61,5 \pm 1,8$  versus  $72 \pm 4,2$  mg/dL,  $p < 0,05$ ), quando comparada à PME. Ao avaliar o HDL aos 60, 90 e 120 DPN, pelo teste estatístico ANOVA de três vias, não se observou diferença significativa na interação tripla de fatores ( $p = 0,3901$ ). Desse modo, a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de duas vias, separando os grupos de acordo com o gênero. A concentração de HDL entre os machos PME e PMH diferiu significativamente apenas para o fator tempo ( $F_{(2, 54)} = 9,19$ ,  $p = 0,0004$ ), independentemente do fator tratamento (Painel B). A análise do HDL sérico das fêmeas revelou efeito significativo do tratamento ( $F_{(1, 54)} = 5,34$ ,  $p = 0,0247$ ), com redução significativa da concentração nas fêmeas PMH aos 120 DPN ( $53,67 \pm 1,78$  versus  $68,37 \pm 3,02$  mg/dL,  $p < 0,05$ ), quando comparada às fêmeas PME (Painel C).



**Figura 17.** Efeito do HGE na concentração sérica de HDL da prole. Painei A: PME: prole de mães eutireoideanas, n=10, 10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10; Painei B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10; Painei C: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, (\*)  $p < 0,05$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Na figura 18, está representada a concentração sérica de VLDL em diferentes tempos. A análise de variância de duas vias evidenciou efeito significativo da interação ( $F_{(1, 34)} = 7,05$ ,  $p = 0,012$ ) e do tempo ( $F_{(1, 34)} = 40,86$ ,  $p < 0,0001$ ), aos 15 e 30 DPN. O pós-teste de Bonferroni indicou diferença significativa aos 15 DPN, quando a concentração de TGL da PMH foi significativamente menor quando comparada à PME ( $15,82 \pm 1,25$  versus  $26,93 \pm 5,32$  mg/dL,  $p = 0,039$ ) (Painei A). Ao avaliar a concentração de VLDL aos 60, 90 e 120 DPN, por meio do teste estatístico ANOVA de três vias, evidenciou-se efeito significativo da interação entre os fatores tratamento, gênero e tempo ( $F_{(2, 120)} = 13,49$ ,  $p < 0,0001$ ) (Painei B). De maneira que, o pós-teste de Bonferroni identificou maior concentração sérica de VLDL nos

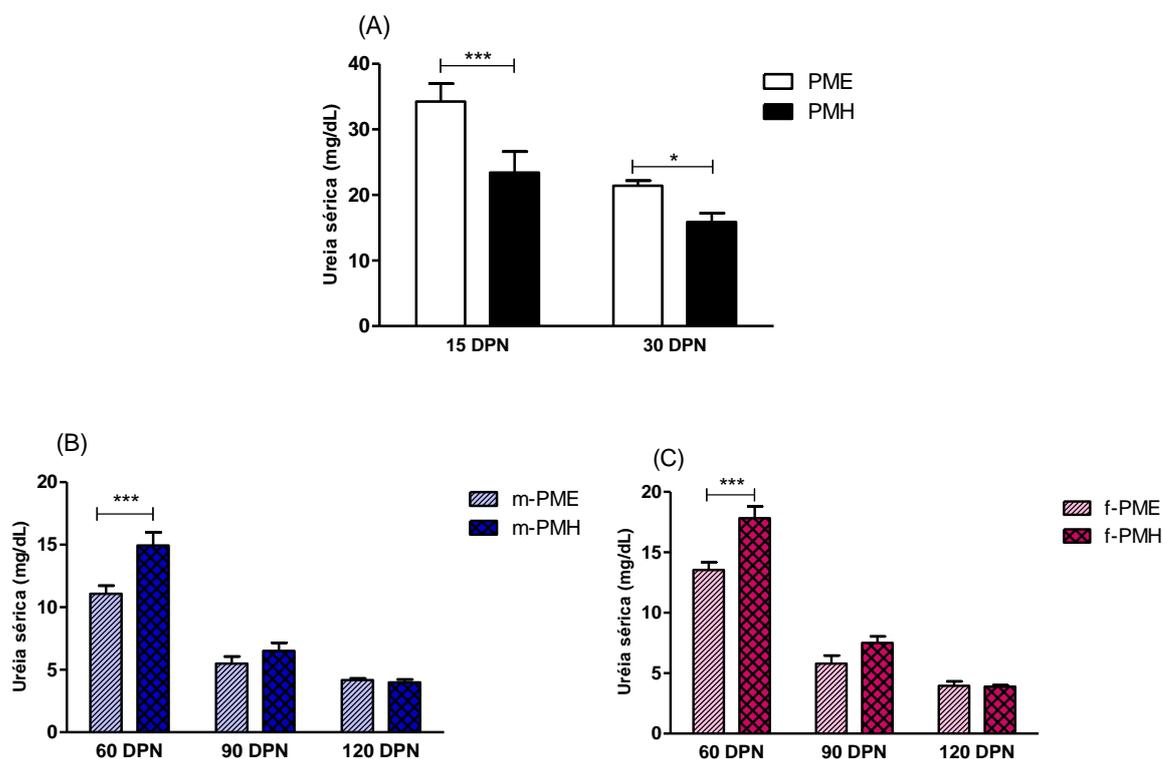
machos PMH aos 60 DPN ( $53,61 \pm 5,03$  versus  $35,28 \pm 3,26$  mg/dL,  $p < 0,01$ ) quando comparado aos m-PME.



**Figura 18.** Efeito do HGE na concentração sérica de VLDL da prole. Paineis A: PME: prole de mães eutireoideanas,  $n=10, 10$ ; PMH: prole de mães hipotireoideanas,  $n=10, 10$ ; Paineis B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas,  $n=10, 10, 10$ ; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas,  $n=10, 10, 10$ ; f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas,  $n=10, 10, 10$ ; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas,  $n=10, 10, 10$ . Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni (Painel A) e ANOVA de três vias seguido do pós-teste de Bonferroni (Painel B); (\*)  $p < 0,05$  (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

Na figura 19 estão representados os valores da concentração sérica de ureia. A análise de variância revelou efeito significativo da interação ( $F_{(1, 34)} = 4,43$ ,  $p = 0,0429$ ), do tratamento ( $F_{(1, 34)} = 32,33$ ,  $p < 0,0001$ ) e do tempo ( $F_{(1, 34)} = 26,64$ ,  $p < 0,0001$ ) (Painel A). O pós-teste de Bonferroni indicou menor uremia na PMH aos 15 ( $20,48 \pm 1,54$  versus  $34,23 \pm 2,7$  mg/dL,  $p < 0,001$ ) e aos 30 DPN ( $15,09 \pm 1,2$  versus  $21,41 \pm 0,8$  mg/dL,  $p < 0,05$ ), quando comparada à PME. Quando a concentração de ureia foi avaliada aos 60, 90 e 120 DPN, pelo o teste estatístico ANOVA de três vias, não se observou significância na interação tripla dos fatores estudados (i.e. tratamento, tempo e gênero) ( $p = 0,944$ ). Assim, realizou-se o teste ANOVA de duas vias, separando machos e fêmeas. A análise dos machos revelou efeito fortemente significativo da interação do tempo com o tratamento ( $F_{(2, 54)} = 5,514$ ,  $p = 0,0066$ ), bem como do tratamento ( $F_{(1, 54)} = 9,361$ ,  $p = 0,0034$ ) e do tempo ( $F_{(1, 54)} = 112,725$ ,  $p < 0,0001$ ) isoladamente. O pós-teste de Bonferroni mostrou que a concentração de ureia nos machos PMH foi maior aos 60 DPN ( $11,07 \pm 0,64$  versus  $14,94 \pm 1,06$  mg/dL,  $p < 0,001$ )

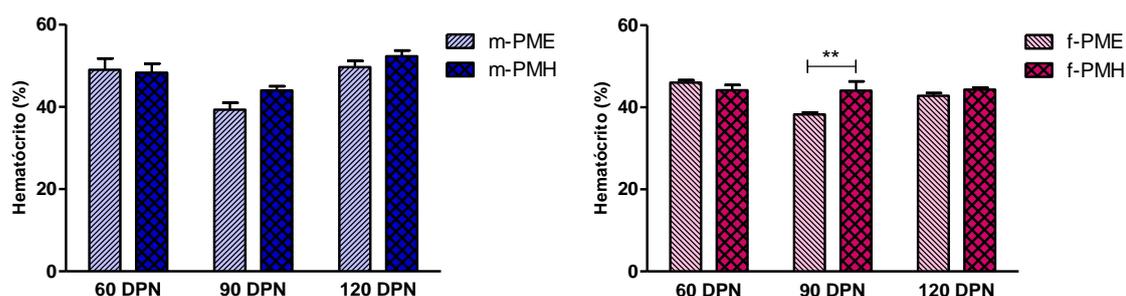
quando comparados aos m-PME (Painel B). Para as fêmeas, verificou-se efeito significativo da interação ( $F_{(2, 54)} = 6,51$ ,  $p = 0,0029$ ), do tratamento ( $F_{(1, 54)} = 15,88$ ,  $p = 0,0002$ ) e do tempo ( $F_{(2, 54)} = 205,4$ ,  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni indicou que a concentração de ureia foi maior nas f-PMH ( $17,82 \pm 0,97$  versus  $13,54 \pm 0,63$  mg/dL,  $p < 0,001$ ) quando comparadas às f-PME (Painel C).



**Figura 19.** Efeito do HGE na concentração sérica de Ureia da prole. Painel A: PME: prole de mães eutireoideanas, n=10, 10; PMH: prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10; Painel B: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10; Painel C: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10, 10, 10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10, 10, 10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

A figura 20 representa os valores de hematócrito nas proles aos 60, 90 e 120 DPN. Na análise de variância de três vias não se detectou interação tripla significativa dos fatores estudados (i.e. tratamento, tempo e gênero) sobre o hematócrito ( $p = 0,820$ ). Dessa maneira,

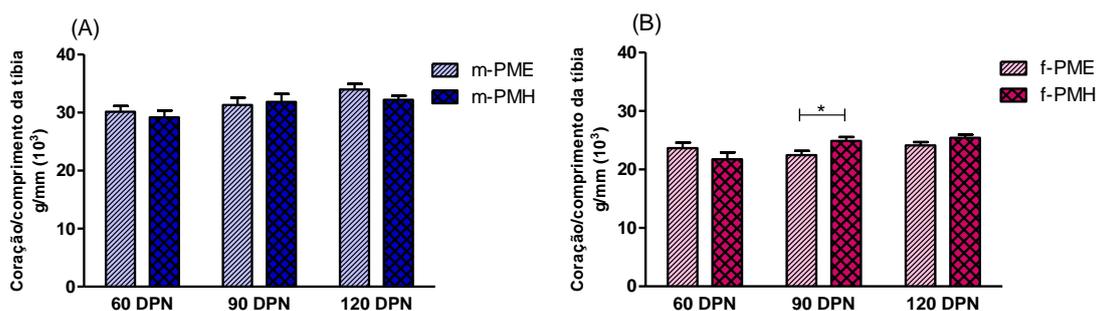
realizou-se a análise de variância de duas vias, separando os grupos de acordo com o gênero. Na análise de machos, o hematócrito sofreu influência apenas do fator tempo ( $F_{(2, 52)} = 14,71$ ,  $p < 0,0001$ ) (Painel A). A análise de variância do hematócrito nas fêmeas revelou haver influência significativa da interação ( $F_{(2, 52)} = 5,95$ ,  $p = 0,0047$ ) dos fatores estudados (i.e. tratamento e tempo), bem como do tempo ( $F_{(2, 52)} = 6,33$ ,  $p = 0,0035$ ) isoladamente. Ademais, observou-se haver forte tendência à significância do fator tratamento ( $F_{(1, 52)} = 3,96$ ,  $p = 0,0519$ ). De maneira que, o pós-teste de Bonferroni indicou menor hematócrito nas fêmeas PMH aos 90 DPN ( $44,05 \pm 2,26$  versus  $38,25 \pm 0,46$ ,  $p < 0,01$ ), quando comparada às f-PME (Painel B).



**Figura 20.** Efeito do HGE no Hematócrito da prole. Painel A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas,  $n=9$ ; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas,  $n=10$ ; Painel B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas,  $n=10$ ; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas,  $n=8$ . Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*\*)  $p < 0,01$ . HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

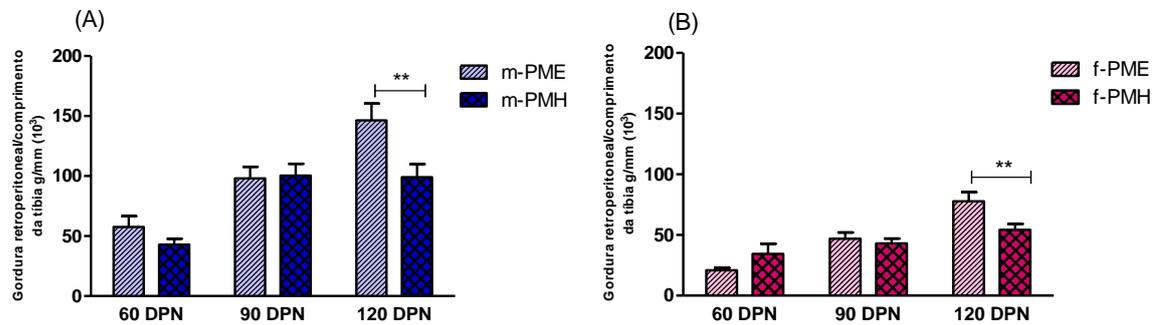
O peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia se encontra expresso na figura 21. A avaliação do peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia, aos 60, 90 e 120 DPN, pelo ANOVA de três vias, não evidenciou interação dos fatores tratamento, tempo e gênero ( $p = 0,961$ ). Porém, quando realizada a análise de variância de duas vias, para os machos, observou-se apenas efeito significativo do fator tempo ( $F_{(2, 51)} = 4,741$ ,  $p = 0,0129$ ) (Painel A). Ao analisar as fêmeas, verificou-se efeito significativo da interação ( $F_{(2, 48)} = 4,123$ ,  $p = 0,0223$ ) e do fator tempo ( $F_{(2, 48)} = 3,75$ ,  $p = 0,03$ ). O pós-teste de Bonferroni

evidenciou que as f-PMH apresentaram maior peso relativo do coração aos 90 DPN ( $24,9 \pm 0,67$  versus  $22,44 \pm 0,74$   $10^3$  g/mm,  $p < 0,05$ ), quando comparadas as f-PME (Painel B).



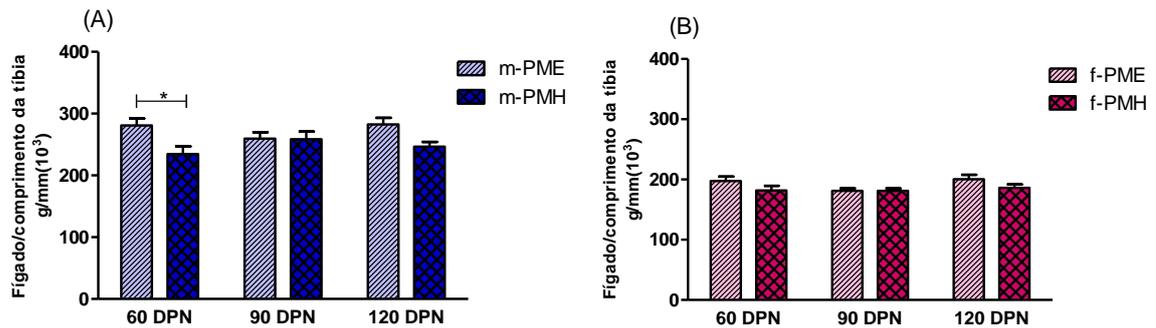
**Figura 21.** Efeito do HGE no peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia da prole. Painel A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=9; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10; Painel B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=8. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*)  $p < 0,05$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

A figura 22 representa o peso da gordura retroperitoneal normalizada pelo comprimento da tíbia, em diferentes idades da prole. A análise de variância de três vias revelou não haver efeito significativo da interação tripla dos fatores tratamento, tempo e gênero ( $p = 0,275$ ). Assim, realizou-se análise de variância de duas vias, separando os grupos de acordo com o gênero. Para os machos, a análise evidenciou efeito significativo da interação ( $F_{(2, 51)} = 3,07$ ,  $p = 0,055$ ), bem como dos fatores tratamento ( $F_{(1, 51)} = 5,44$ ,  $p = 0,023$ ) e tempo ( $F_{(2, 51)} = 24, 01$ ,  $p < 0,0001$ ). De acordo com o pós-teste de Bonferroni, a diferença foi significativa aos 120 DPN, em que os machos PMH apresentaram menor conteúdo de gordura ( $99,2 \pm 1,08$  versus  $146,4 \pm 1,4$   $10^3$  g/mm), quando comparados aos machos PME (Painel A). A análise da gordura retroperitoneal relativa das fêmeas evidenciou efeito significativo da interação ( $F_{(2, 48)} = 5,18$ ,  $p = 0,0092$ ) e do tempo ( $F_{(2, 48)} = 22,22$ ,  $p < 0,0001$ ). O pós-teste de Bonferroni demonstrou haver diferença significativa aos 120 DPN, em que as f-PMH apresentaram menor peso de gordura retroperitoneal ( $54,23 \pm 4,9$  versus  $77,81 \pm 7,48$   $10^3$  g/mm) quando comparadas às f-PME (Painel B).



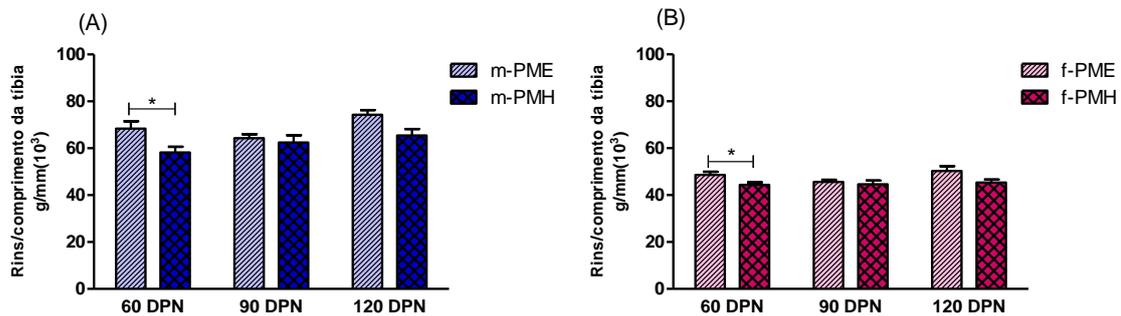
**Figura 22.** Efeito do HGE no peso da gordura retroperitoneal normalizada pelo comprimento da tíbia da prole. Painel A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10; Painel B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*\*)  $p < 0,01$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

O peso do fígado normalizado pelo comprimento da tíbia, em diferentes idades da prole, está expresso na figura 23. A análise de variância de três vias não revelou diferença significativa no peso do fígado normalizado pelo comprimento da tíbia ( $p = 0,482$ ). Assim, realizou-se o teste ANOVA de duas vias, separando os gêneros. Para os machos, a análise de variância evidenciou efeito significativo apenas do fator tratamento ( $F_{(2, 51)} = 9,98$ ,  $p = 0,002$ ). O pós-teste de Bonferroni indicou menor peso relativo do fígado, nos m-PMH, aos 60 DPN ( $234,4 \pm 12,1$  versus  $280,9 \pm 11,3$   $10^3$ g/mm,  $p < 0,05$ ) (Painel A). Nas fêmeas, foi não foi evidenciado efeito significativo dos fatores analisados (Painel B).



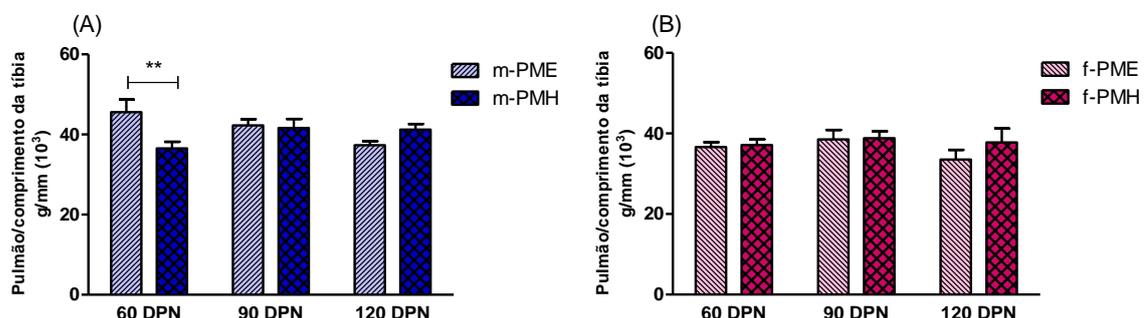
**Figura 23.** Efeito do HGE no peso do fígado normalizado pelo comprimento da tíbia da prole. Painel A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10; Painel B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, (\*)  $p < 0,05$ , comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

O peso dos rins normalizado pelo comprimento da tíbia dos grupos PME e PMH, de ambos os gêneros, está representado na figura 24. Quando realizada análise de variância de três vias, não foi verificada a interação tripla dos fatores estudados (i.e. tratamento, tempo e gênero) ( $p = 0,718$ ). Assim, realizou-se a análise de variância de duas vias, separando os grupos de acordo com o gênero. Para os machos, verificou-se diferença significativa no fator tratamento ( $F_{(1, 51)} = 10,99$ ,  $p = 0,0018$ ) e no fator tempo ( $F_{(2, 51)} = 4,43$ ,  $p = 0,017$ ), porém sem interação dos mesmos. O peso relativo dos rins foi menor nos m-PMH aos 60 DPN ( $58,18 \pm 2,5$  versus  $68,34 \pm 3,2$  g/mm  $10^3$ ,  $p < 0,05$ ) (Painel A). Para as fêmeas, evidenciou-se a interferência apenas do fator tratamento ( $F_{(1, 49)} = 7,4$ ,  $p = 0,0079$ ). De acordo com o pós-teste de Bonferroni, o peso relativo dos rins foi menor nas f-PMH aos 60 DPN ( $44,38 \pm 1,05$  versus  $48,65 \pm 1,28$  (g/mm) $10^3$ ,  $p < 0,05$ ), quando comparadas às f-PME (Painel B).



**Figura 24.** Efeito do HGE no peso dos rins normalizado pelo comprimento da tíbia da prole. Paineis A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10; Paineis B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

A figura 25 representa o peso do pulmão normalizado pelo comprimento da tíbia das proles de ambos os gêneros. Não foi observada diferença significativa na análise de variância de três vias ( $p = 0,130$ ), considerando-se os fatores tratamento, tempo e gênero. Porém, separando-se os animais por gênero, com a análise de variância de duas vias, foi possível detectar significância para a interação dos fatores tratamento e tempo nos machos ( $F_{(2, 50)} = 5,81$ ,  $p = 0,0054$ ). O pós-teste evidenciou diferença significativa apenas aos 60 DPN, em que os m-PMH apresentaram um menor peso relativo do pulmão ( $36,51 \pm 1,6$  versus  $45,56 \pm 3,17$  (g/mm) $10^3$ ,  $p < 0,01$ ) (Painel A). Na análise das fêmeas, nenhuma diferença foi observada para esta variável (Painel B).



**Figura 25.** Efeito do HGE no peso do pulmão normalizado pelo comprimento da tíbia da prole. Paineis A: m-PME: machos da prole de mães eutireoideanas, n=10; m-PMH: machos da prole de mães hipotireoideanas, n=10; Paineis B: f-PME: fêmeas da prole de mães eutireoideanas, n=10; f-PMH: fêmeas da prole de mães hipotireoideanas, n=10. Análise estatística: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni; (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado ao respectivo controle. HGE: hipotireoidismo gestacional experimental; DPN: dia pós-natal.

**RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTE TRABALHO:**

**RATAS PRENHAS**

**Quadro 1. Resumo dos resultados obtidos nas mães hipotireoideanas (MH).**

<b>Tempo de gestação</b>	↑
<b>Número de filhotes</b>	NA
<b>Massa corporal (1°, 9° e 21° DG)</b>	NA
<b>Peso relativo do coração</b>	↓
<b>Peso relativo dos rins</b>	↓
<b>Peso relativo do fígado</b>	NA
<b>Peso relativo do pulmão</b>	NA
<b>Dosagem de T3 (21° DG)</b>	↓
<b>Dosagem de T4 (21° DG)</b>	↓

**NA: não alterou**

**PROLE DE MÃES HIPOTIREOIDEANAS AO LONGO DA VIDA PÓS-NATAL**

**Quadro 2. Resumo dos resultados obtidos na prole de mães hipotireoideanas (PMH) ao longo da vida pós-natal.**

	15 DPN	30 DPN	60 DPN		90 DPN		120 DPN	
			M	F	M	F	M	F
T3	NA	NA	-	-	-	-	-	-
T4	NA	NA	-	-	-	-	-	-
Massa corporal	NA	↓	↓	↓	↓	NA	↓	↓
Ingestão (ração, água e sódio)	-	NA	NA	-	NA	-	NA	-
Ingestão induzida de sódio	-	-	-	-	-	-	NA	-
TTI	-	-	-	-	-	-		↓
TTG	-	-	-	-	-	-	NA	NA
Glicose sérica	↓	NA	NA	↑	NA	NA	NA	NA
Colesterol sérico	NA	NA	↑	NA	NA	NA	↓	↓
TGL e VLDL séricos	↓	NA	↑	NA	NA	NA	NA	NA
HDL sérico	NA	↓	NA	NA	NA	NA	NA	↓
Ureia sérica	↓	↓	↑	↑	NA	NA	NA	NA
Hematócrito	-	-	NA	NA	NA	↑	NA	NA
Peso do coração	-	-	NA	NA	NA	↑	NA	NA
Peso da gordura retrop.	-	-	NA	NA	NA	NA	↓	↓
Peso do fígado	-	-	↓	NA	NA	NA	NA	NA
Peso dos rins	-	-	↓	↓	NA	NA	NA	NA
Peso do pulmão	-	-	↓	NA	NA	NA	NA	NA

NA: não alterou

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a carência de hormônios tireoideanos durante a vida intrauterina afeta o desenvolvimento corporal, perfil metabólico e o peso dos órgãos em diferentes idades da vida pós-natal em ratos. Além disso, constatou que, a menor massa corporal observada em diferentes idades não foi acompanhada por redução na ingestão de ração. Outro achado inédito é a presença de dimorfismo sexual no comportamento do perfil metabólico de triglicérides e VLDL em função da idade e do tratamento. Foi evidenciado, ainda, menor peso relativo da gordura retroperitoneal na prole de ambos os gêneros.

Devido à influência potencial dos HTs no crescimento, desenvolvimento e metabolismo (AHMED *et al.*, 2012), e considerando que o desenvolvimento intrauterino depende de concentrações adequadas de HTs (FOWDEN; SILVER, 1995), o presente estudo investigou as repercussões da indução do hipotireoidismo gestacional experimental no desenvolvimento corporal, comportamento ingestivo e função metabólica durante a vida pós-natal na prole.

A administração de MTZ na água de beber (0,02%) em fêmeas adultas durante a gestação induziu hipotireoidismo nas mães, constatado por concentrações séricas reduzidas de T3 e T4 totais ao 21<sup>o</sup> DG (Fig. 2). Segundo Karbalaei *et al.* (2013), a administração de PTU (0,02%) na água de beber de ratas, do primeiro DG até o parto, causou redução nos concentrações circulantes de T3 e T4 totais (KARBALAEI *et al.*, 2013). Hasebe *et al.* (2008) induziram hipotireoidismo em ratas prenhas do 17<sup>o</sup> DG até o final da lactação pela administração de MTZ (20mg/kg/dia) e evidenciaram baixas concentrações plasmáticas de T3 e T4 nas mães tratadas e suas proles (HASEBE *et al.*, 2008).

No presente estudo, a duração da gestação foi significativamente aumentada no grupo MH quando comparada ao grupo ME (Tabela 1). Este achado está de acordo com as observações de Hapon *et al.* (2003), que induziram hipotireoidismo em ratas oito dias antes do acasalamento, com administração de PTU na água de beber, e identificaram aumento no tempo de gestação (HAPON *et al.*, 2003). Segundo Hapon *et. al* (2003), o hipotireoidismo em ratas prenhas produz o prolongamento na gestação devido a concentrações elevadas de progesterona, esse hormônio inibe a contratilidade do miométrio. Contrariamente, no hipertireoidismo gestacional, ratas prenhas tratadas com T4 apresentam decaimento mais acentuado dos concentrações de progesterona, aumento da prolactina, antecipação da luteólise, que por sua vez induz a lactogênese e o parto em ratas.

Negishi *et al.* (2005) induziram hipotireoidismo perinatal pela administração de PTU (10mg/kg) em ratas prenhas do 3<sup>o</sup> DG até o final da lactação (20 DPN), e evidenciaram que as ratas tratadas exibiram um menor ganho de massa corporal durante a gestação (NEGISHI *et al.*, 2005). Diferentemente, no presente estudo, a administração oral de MTZ em ratas prenhas não afetou a massa corporal durante a gestação (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo aos de Alves *et al.* (2013), que utilizaram o mesmo protocolo de indução de hipotireoidismo em ratos (ALVES *et al.*, 2013). De acordo com os autores, esse achado aponta para a possibilidade de que uma hipofunção tireoideana não gere, necessariamente, “sinais e sintomas” clássicos nas gestantes.

Similarmente aos achados do presente estudo, Alves *et al.* (2013) não identificaram diferenças no número de filhotes por ninhada das ratas tratadas com MTZ (0,02%), quando comparadas as ratas eutireoideanas (ALVES *et al.*, 2013). Esses dados estão de acordo com os demonstrados por Karbalai *et al.* (2013), que apesar de induzir hipotireoidismo em ratas durante toda a gestação, pela administração de PTU (0,02%), não observaram diferenças entre os grupos no que diz respeito ao número de filhotes por ninhada (KARBALAEI *et al.*, 2013).

As drogas anti-tireoideanas, MTZ e PTU, quando administradas por via oral, atravessam a barreira placentária e também podem ser encontradas no leite materno (CLARK *et al.*, 2006). Diversos estudos mostraram que ratas prenhas tratadas com drogas anti-tireoideanas, durante a gestação e/ou lactação, produziram prole com hipotireoidismo nos

primeiros dias de vida (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010; HASEBE *et al.*, 2008; KARBALAEI *et al.*, 2013; SWENNE, 1983).

Karbalaei *et al.* (2013) demonstraram que a indução de hipotireoidismo fetal (1<sup>o</sup> DG até o parto) promoveu redução nas concentrações de T4 nos ratos neonatos, no entanto, aos três e 12 meses pós-natal, as concentrações séricas de T3 e T4 não diferiram entre os grupos (KARBALAEI *et al.*, 2013). Ausó *et al.* (2004) induziram hipotireoidismo em ratas prenhas, com tratamento mais curto, do 12<sup>o</sup> DG ao 15<sup>o</sup> DG, sendo que a administração de MTZ (0,02%) nas mães não afetou a função tireoideana da prole aos 40 DPN (AUSÓ *et al.*, 2004).

No presente trabalho, no qual a indução do hipotireoidismo ocorreu exclusivamente durante a gestação, as concentrações séricas de T3 e T4 totais não diferiram entre os grupos avaliados aos 15 DPN e 30 DPN (Figura 4). Portanto, o presente protocolo não afetou o *status* tireoideano da prole, ao menos nos tempos avaliados. Porém, considerando-se que o MTZ permanece concentrado na tireóide por até 24 h pós-administração (CLARK *et al.*, 2006), e ainda que o mesmo atravesse a barreira placentária e é excretado no leite pelas glândulas mamárias, pode-se assumir que durante a fase final da vida intrauterina e também no período neonatal precoce (anterior ao 15<sup>o</sup> DPN), estes animais pudessem apresentar hipofunção tireoideana. No entanto, o período exato em que ocorre o re-estabelecimento da função tireoideana permanece desconhecido. De modo intrigante, apesar desse reestabelecimento ter ocorrido antes do 15<sup>o</sup> DPN, diversos dos parâmetros metabólicos avaliados neste estudo se apresentaram alterados ao longo da vida destes animais, desde os 15 até os 120 DPN. Isto reforça a hipótese de que os hormônios da tireóide são críticos na programação dos sistemas controladores das funções metabólicas com impacto em diferentes idades.

Déficits de crescimento e de massa corporal da prole tem sido comumente encontrados em experimentos nos quais o hipotireoidismo foi induzido em ratas durante o período gestacional e neonatal (ALVES *et al.*, 2013; KARBALAEI *et al.*, 2013; NEGISHI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2012; SWENNE, 1983; USENKO *et al.*, 1999). Apesar disso, a massa corporal dos filhotes avaliados, no presente estudo, não diferiu entre os grupos do 1<sup>o</sup> DPN até 15<sup>o</sup> DPN (Figura 5). Esses dados corroboram os de Santos *et al.* (2012), que

utilizaram o mesmo protocolo de indução de hipotireoidismo gestacional (SANTOS *et al.*, 2012).

Estudo prévio, com modelo de hipotireoidismo moderado por tireóidectomia (redução de 80% da tireóide), em ratas antes do acasalamento, evidenciou redução na massa corporal da prole de ratas tratadas no 16<sup>o</sup> DG, que desaparece já no 21<sup>o</sup> DG (PICKARD *et al.*, 1999). No entanto, a indução de hipotireoidismo grave (retirada total da glândula) promoveu redução da massa corporal da prole até o final da gestação (LEONARD *et al.*, 1999). De maneira geral, pode-se inferir que a persistência e a gravidade da restrição do crescimento da prole estão relacionadas ao grau de indução de disfunção da tireóide materna (PICKARD *et al.*, 1999).

Corroborando esses achados, Bonet *et al.* (1988) mostraram, por meio da indução de hipotireoidismo materno por tireoidectomia (TX) em ratas, com ou sem reposição de T4, que a tireoidectomia materna reduz consideravelmente as concentrações de HTs em estruturas embrionárias durante a primeira metade da gestação, além de interferir no desenvolvimento normal do feto. Em contraste, quando o hipotireoidismo materno ocorre na segunda metade da gestação, os efeitos não foram tão deletérios, pois a glândula tireóide fetal já possui atividade (BONET; HERRERA, 1988).

De maneira geral, os hormônios podem regular os mecanismos de fome e saciedade, alterar a taxa metabólica de diversas rotas bioquímicas e modular o sistema imunológico. Disfunções endócrinas são observadas em animais cujas mães foram submetidas à desnutrição, eventos estressantes, disfunções hormonais ou tratamento durante a gestação e/ou lactação (AHMED *et al.*, 2012; DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; FAGUNDES *et al.*, 2007; KARBALAEI *et al.*, 2013; LISBOA *et al.*, 2003). Nesse trabalho, o comportamento de ingestão alimentar da PMH e PME foi monitorado desde o período de lactação até a vida adulta (Figuras 6 e 7). No período da lactação, a avaliação aos 5 DPN e 15 DPN, não evidenciou diferenças na ingestão de leite materno e na massa corporal entre as proles avaliadas. Curiosamente, ao aferir a ingestão de ração de 30 DPN a 120 DPN, apesar de não serem encontradas diferenças no consumo de ração, a massa corporal foi significativamente menor nos machos PMH, quando comparados aos machos PME.

Santos *et al.* (2012), utilizando o mesmo protocolo de indução de HGE, verificaram aumento da pressão arterial acompanhado de aumento do tono simpático para os vasos de resistência na PMH. Assim, é possível que os machos filhos de mães hipotireoideanas, do presente estudo, apresentem aumento da atividade simpática em outros órgãos, o que pode elevar as concentrações plasmáticas de catecolaminas e corticosterona, resultando num estado hipercatabólico, que explicaria a menor massa corporal, apesar da ingestão semelhante. Nesse contexto, é conhecido que as catecolaminas aumentam a conversão de T4 a T3 por meio da estimulação da D2 e aumentam a retenção dos receptores de HTs no núcleo das células (BILEZIKIAN; LOEB, 1983; CROZATIER *et al.*, 1991; ROTHWELL; STOCK; SUDERA, 1985). De acordo com esses achados, não se pode excluir a possibilidade desses animais apresentarem um hipertireoidismo tecidual, possivelmente pela estimulação aumentada do SNS. Essa, por sua vez, estimularia a maior produção das catecolaminas, as quais aumentariam a atividade das deiodases extra-tireoideanas e, conseqüentemente, maior produção tecidual de T3. A interação sinérgica dos HTs e SNS é essencial, por exemplo, na resposta à exposição ao frio, quando ambos os sistemas interagem para aumentar a produção de calor (SILVA; BIANCO, 2008). No entanto, ainda não se conhece o funcionamento, tampouco a existência de interação do eixo HPT e da atividade simpática na prole que foi submetida à carência de HTs no período fetal.

O comportamento ingestivo induzido por depleção de sódio associado à dieta deficiente em sódio também foi investigado no presente estudo (Figuras 8 e 9). Sabe-se que a furosemida é um potente agente diurético que atua no ramo ascendente da alça de Henle, inibindo aí a reabsorção ativa de sódio. Esse fármaco promove diurese e natriurese, resultando em depleção de água e sódio, sendo um poderoso estímulo do SRA (FITZSIMONS, 1998). Adicionalmente, a sede induzida por desidratação extracelular, depende, em parte, da síntese renal de renina e formação periférica de ANG II (MECAWI *et al.*, 2010). Após 24 h da depleção de NaCl, induzida por administração de furosemida e seguida de dieta deficiente em sódio, os animais da PMH exibiram concentrações similares de ingestão de água e NaCl 0,3 M, comparado à PME. Assim, esses achados mostraram que estes comportamentos ingestivos, quando induzidos por depleção de sódio, não foram afetados pela carência de HTs na gestação, ao menos nos machos e na idade estudada (120 DPN). Porém, deve-se levar em

conta que a investigação das repercussões de eventos ocorridos durante a vida intrauterina ao longo da vida pós-natal não pode se basear apenas em uma observação pontual (i.e. em uma única idade). Sendo assim, não se pode descartar que um desajuste nos sistemas de controle dos comportamentos que regulam o desafio imposto por este protocolo pudesse ter sido evidenciado em outros tempos mais precoces ou tardios.

Seguindo para a investigação do perfil bioquímico destes animais, no presente estudo, foi realizado o TTI e o TTG, na prole de machos e fêmeas aos 120 DPN. Verificou-se que, tanto no TTI como no TTG, os machos PMH apresentaram respostas glicêmicas semelhantes aos machos do grupo controle (Figuras 10 e 11). Karbalaei *et al.* (2013)(KARBALAEI *et al.*, 2013) induziram hipotireoidismo gestacional (PTU 0,02%), em ratas prenhas do 1<sup>o</sup> DG até o parto e observaram que a prole de machos de mães com hipotireoidismo apresentou intolerância à glicose e redução na capacidade de secreção de insulina, somente aos 360 dias de vida, o mesmo não foi evidenciado aos 90 dias. Assim, é possível que o tempo de indução do hipotireoidismo gestacional programe, de maneira diferente, a homeostase glicêmica na prole, ou seja, a indução de hipotireoidismo mais grave, que ocorre durante toda a vida intrauterina, cause maiores prejuízos ao desenvolvimento pancreático. No entanto, as variações nos protocolos de indução do hipotireoidismo gestacional, bem como as diferenças nas idades estudadas, torna difícil a comparação dos estudos.

O perfil e a resposta glicêmica nas fêmeas também foram avaliados aos 120 DPN. Assim, verificou-se que as fêmeas PMH apresentaram menor capacidade em reduzir a glicemia após administração de insulina *i.p.*, além de glicemia de jejum maior que a prole controle, no entanto, não foi verificada diferenças no TTG (Figuras 12, 13 e 14). Esses resultados evidenciam que apesar das fêmeas PMH não apresentarem intolerância à glicose, visto que o comportamento da curva glicêmica ao longo do tempo foi semelhante à curva das fêmeas do grupo controle, as mesmas apresentaram resistência periférica à ação da insulina. Este achado aponta para a possibilidade da existência de alterações na via de sinalização da insulina, na translocação de transportadores de glicose, ou ainda, na atividade de enzimas intracelulares. Neste contexto, o fato do TTG não ter sido alterado pode ser devido a uma compensação do pâncreas que diante de uma sobrecarga de glicose aumenta a secreção de

insulina, na tentativa de controlar a concentração de glicose no sangue (AVRAMOGLU; BASCIANO; ADELI, 2006). Diante destes achados, se faz necessário investigar na PMH, a presença de defeitos na ação da insulina sob a condição de jejum, bem como quantificar a secreção de insulina pelo pâncreas após a administração de glicose *i.p.*

Partindo do pressuposto de que os HTs possuem efeitos variados no metabolismo hepático de lipídeos (DUNTAS; MANTZOU; KOUTRAS, 2002), o presente estudo realizou a avaliação do perfil lipídico e no peso relativo do fígado na prole de mães submetida à carência de HTs durante a gestação. É conhecido que o fígado está envolvido em múltiplos processos importantes da homeostase geral do colesterol como, por exemplo, na síntese endógena de colesterol, no armazenamento e no transporte reverso de colesterol (MURPHY *et al.*, 2005). No presente trabalho, menor peso relativo do fígado, além de elevação do colesterol total e das concentrações de TGL e VLDL, foi observado apenas nos machos PMH aos 60 DPN (Figuras 15, 16, 18 e 23). Assim, apesar de menor peso desse órgão, a produção de lipídeos foi superior ao grupo controle, sugerindo um possível aumento na síntese ou reduzido *clearance* de colesterol (i.e. redução na produção de ácido biliar). Quando esses mesmos parâmetros foram avaliados aos 120 DPN, observou-se redução apenas do colesterol nos machos e fêmeas PMH, comparados aos respectivos controles.

Ainda em relação ao metabolismo de lipídeos, foi analisada a concentração de HDL sérico na prole. Essa lipoproteína, que é produzida pelo fígado, foi reduzida na PMH, aos 30 DPN, e nas fêmeas PMH aos 120 DPN (Figura 17). Adicionalmente, é conhecido que o HDL auxilia no transporte reverso de colesterol, isto é, dos tecidos extra-hepáticos para o fígado (YANCEY *et al.*, 2003). Assim, reduzidas concentrações de HDL, como encontrado no presente trabalho pode favorecer o aparecimento de mudanças pró-aterogênicas.

De maneira geral, o comportamento instável dos parâmetros lipídicos nos machos e nas fêmeas PMH, ao longo do tempo, pode ser devido à descalibração do sistema de controle das vias metabólicas dessas lipoproteínas, ou decorrente de um atraso no desenvolvimento desse sistema. No entanto, esses achados merecem ser avaliados mais precisamente. De tal modo, sugere-se a investigação do metabolismo lipídico no fígado, tais como a mensuração de enzimas que promovem a síntese e transporte de colesterol (i.e. HMG coA e proteína

transportadora de ésteres de colesterol - CEPT), além da avaliação da função hepática (i.e. albumina, transaminase glutâmica pirúvica sérica -TGO, transaminase glutâmica oxalacética sérica -TGP).

No que diz respeito ao metabolismo proteico, no presente estudo foi avaliado o perfil da ureia sérica em PMH e PME. É sabido que todos os aminoácidos que não são utilizados na síntese proteica são convertidos à ureia, na mitocôndria e citosol dos hepatócitos (Grillo MA, 1964). Assim, neste estudo verificou-se redução na ureia sérica do grupo PMH aos 15 e 30 DPN (Figura 19). É provável que, apesar da PMH apresentar um *status* eutireoideano, nessas idades avaliadas, a D1 hepática, responsável pela deiodação de T4 a T3 no fígado, se apresente hipoativa, resultando em menor conversão de T4 a T3, e assim, menor disponibilidade de T3 para ativar as enzimas que participam do ciclo da ureia.

A avaliação da ureia sérica aos 60 DPN se apresentou maior nos machos e fêmeas PMH que em seus respectivos controles. Simultaneamente, observou-se redução no peso relativo dos rins, aos 60 DPN, na PMH de ambos os gêneros. Uma provável explicação para tais achados seria a redução da filtração glomerular, gerando acúmulo de ureia no sangue. Apesar do número de néfrons ser determinado geneticamente, um número crescente de evidências indicam a influência de fatores não genéticos que afetam o desenvolvimento intrauterino do número de néfrons, como por exemplo, a baixa ingestão proteica e tratamento com glicocorticoides (WINTOUR *et al.*, 2003; WLODEK *et al.*, 2008). Dessa maneira, é possível que a ausência de HTs no ambiente intrauterino tenha prejudicado o desenvolvimento e a função renal na prole adulta. No entanto, além da mensuração da ureia, faz-se necessário uma investigação mais completa do funcionamento renal, como por exemplo, dosagem de proteínas séricas, como o *clearance* de creatinina, inulina e de para-aminohipurato (PAH, utilizado como estimativa do fluxo sanguíneo renal).

Os HTs regulam positivamente a homeostase metabólica, como por exemplo, inúmeros efeitos no metabolismo lipídico, dentre os quais se destaca a lipogênese e lipólise no tecido adiposo (OPPENHEIMER *et al.*, 1991). Nesse contexto, a redução no peso relativo da gordura retroperitoneal observado na PMH de ambos os gêneros, aos 120 DPN, pode estar relacionada ao aumento nos concentrações de T3 e T4 e/ou maior atividade da D1 e D2 no

tecido adiposo (figura 22). Diante de tais resultados, faz-se necessário avaliar as concentrações dos HTs, mas, sobretudo a biodisponibilidade das deiodases teciduais, além da mensuração da lipólise basal no tecido adiposo.

No presente trabalho, observou-se redução no índice do peso do pulmão pelo comprimento da tibia apenas nos machos PMH aos 60 dias de vida (Figura 25). Estes achados demonstram que nesta idade, quando este parâmetro começou a ser avaliado, o desenvolvimento pulmonar parecia ainda estar incompleto e mais atrasado em relação aos controles. Esta diferença desapareceu já nos tempos seguintes avaliados. Deve-se ressaltar que as repercussões do HGE na função pulmonar não constituiu objetivo específico do presente trabalho, mas este achado torna evidente a necessidade de se investigar possíveis alterações nos mecanismos de controle da função respiratória e capacidade de trocas gasosas.

Por fim, este estudo abre fronteiras para que novas abordagens sejam realizadas com o objetivo de investigar os mecanismos que expliquem as diferenças observadas neste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que a indução do HGE foi efetiva em reduzir as concentrações de T3 e T4 nas ratas tratadas, promovendo:

- Redução no peso relativo do coração e rins ao final da gestação, sem alterar a massa corporal.
- Aumento do tempo de gestação, sem alterar o número de filhotes por ninhada;

Conclui-se ainda que a carência de hormônios tireoideanos durante a vida intrauterina afeta o desenvolvimento ontogênico da prole, determinando:

- Redução na evolução da massa corporal, sem mudanças na ingestão de ração;
- Menor sensibilidade à ação da insulina e elevada glicemia de jejum em fêmeas, mas não em machos;
- Instabilidade no perfil bioquímico de diversos indicadores metabólicos como glicose, colesterol, HDL, TGL, VLDL e ureia, sem alterações nas concentrações hormonais de T3 e T4.
- Retardo e redução no desenvolvimento de diversos órgãos relacionados com mecanismos reguladores de vias metabólicas de lipídeos, proteínas e carboidratos, como o fígado e a gordura retroperitoneal;

## 8 REFERÊNCIAS

ABRAMS, J. J.; GRUNDY, S. M.; GINSBERG, H. Metabolism of plasma triglycerides in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. **Journal of lipid research**, v. 22, n. 2, p. 307–322, fev. 1981.

AHMED, O. M. *et al.* Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: II-the developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 517–537, out. 2012.

AHMED, O. M.; ABD EL-TAWAB, S. M.; AHMED, R. G. 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: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 437–454, out. 2010.

ALVES, I. G. N. *et al.* Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats. **European journal of pain (London, England)**, 27 mar. 2013.

AMATI, F. *et al.* Improvements in insulin sensitivity are blunted by subclinical hypothyroidism. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 41, n. 2, p. 265–269, fev. 2009.

ANTUNES RODRIGUES, J.; COVIAN, M. R. HYPOTHALAMIC CONTROL OF SODIUM CHLORIDE AND WATER INTAKE. **Acta physiologica latino americana**, v. 13, p. 94–100, 1963.

AUSÓ, E. *et al.* A Moderate and Transient Deficiency of Maternal Thyroid Function at the Beginning of Fetal Neocortigenesis Alters Neuronal Migration. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4037–4047, 9 jan. 2004.

AVRAMOGLU, R. K.; BASCIANO, H.; ADELI, K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 368, n. 1-2, p. 1–19, jun. 2006.

BADAUE-PASSOS, D. *et al.* Effect of losartan on sodium appetite of hypothyroid rats subjected to water and sodium depletion and water, sodium and food deprivation. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 5, p. 621–628, 2001.

BARKER, D. J. The intrauterine origins of cardiovascular disease. **Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement**, v. 82 Suppl 391, p. 93–99; discussion 100, set. 1993.

BARKER, D. J. An appreciation of “Studies on infant mortality” by Barnet Woolf. **Journal of epidemiology and community health**, v. 50, n. 6, p. 620, dez. 1996.

BASSETT, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 1–11, 31 dez. 2003.

BATES, J. M. *et al.* Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2490–2500, jul. 2000.

BAXTER, J. D.; TYRRELL, J. B. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: importance in steroid therapy, AIDS, and other stress syndromes. **Advances in internal medicine**, v. 39, p. 667–696, 1994.

BECKETT, G. J. *et al.* Inhibition of type I and type II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. **The Biochemical journal**, v. 259, n. 3, p. 887–892, 1 maio 1989.

BEHNE, D. *et al.* Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 173, n. 3, p. 1143–1149, 31 dez. 1990.

BELLÓ, A. A.; COVIAN, M. R. Rats with spontaneous high level of NaCl intake have hypothyroidism. **Physiology & behavior**, v. 50, n. 5, p. 1071–1073, nov. 1991.

BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 13, n. 11, p. 1005–1012, nov. 2003.

BIANCO, A. C. *et al.* Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 1, p. 38–89, fev. 2002.

BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocrine reviews**, v. 4, n. 4, p. 378–388, 1983.

BONET, B.; HERRERA, E. Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. **Endocrinology**, v. 122, n. 2, p. 450–455, fev. 1988.

BRADLEY, D. J.; TOWLE, H. C.; YOUNG, W. S., 3rd. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 2288–2302, jun. 1992.

BRADLEY, S. E. *et al.* The thyroid and the kidney. **Kidney international**, v. 6, n. 5, p. 346–365, nov. 1974.

BRENTA, G. *et al.* Acute thyroid hormone withdrawal in athyreotic patients results in a state of insulin resistance. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 19, n. 6, p. 665–669, jun. 2009.

BROWN, A. L. *et al.* Racial differences in the incidence of congenital hypothyroidism. **The Journal of pediatrics**, v. 99, n. 6, p. 934–936, dez. 1981.

BURINI, R. *et al.* Interaction of thyroid status and diet on muscle protein breakdown in the rat, as measured by N tau-methylhistidine excretion. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 30, n. 7, p. 679–687, jul. 1981.

CARAYANNIOTIS, G. Recognition of thyroglobulin by T cells: the role of iodine. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 17, n. 10, p. 963–973, out. 2007.

CASEY, B. M.; LEVENO, K. J. Thyroid disease in pregnancy. **Obstetrics and gynecology**, v. 108, n. 5, p. 1283–1292, nov. 2006.

CASSIO, A. *et al.* Treatment for congenital hypothyroidism: thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine? **Pediatrics**, v. 111, n. 5 Pt 1, p. 1055–1060, maio 2003.

CAVALLO-PERIN, P. *et al.* Insulin resistance in Graves' disease: a quantitative in-vivo evaluation. **European journal of clinical investigation**, v. 18, n. 6, p. 607–613, dez. 1988.

CETTOUR-ROSE, P. *et al.* Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilisation, a defect partially corrected by central leptin infusion. **Diabetologia**, v. 48, n. 4, p. 624–633, abr. 2005.

CHAIT, A.; BIERMAN, E. L.; ALBERS, J. J. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. **The Journal of clinical investigation**, v. 64, n. 5, p. 1309–1319, nov. 1979.

CHAN, S. Y.; VASILOPOULOU, E.; KILBY, M. D. The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. **Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism**, v. 5, n. 1, p. 45–54, jan. 2009.

CHOPRA, I. J.; TAING, P.; MIKUS, L. Direct determination of free triiodothyronine (T3) in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay (RIA). **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 6, n. 4, p. 255–259, ago. 1996.

CHOU, W.-Y. *et al.* Human spot 14 protein interacts physically and functionally with the thyroid receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 357, n. 1, p. 133–138, 25 maio 2007.

CLARK, S. M. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacotherapy of thionamides in pregnancy. **Therapeutic drug monitoring**, v. 28, n. 4, p. 477–483, ago. 2006.

COOPER, D. S. Antithyroid drugs. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 21, p. 1353–1362, 22 nov. 1984.

CRISPELL, K. R.; KAHANA, S.; HYER, H. The effect of plasma on the in vitro uptake or binding by human red cells of radioactive I-131 labeled L-thyroxine and L-triiodothyronine. **The Journal of clinical investigation**, v. 35, n. 1, p. 121–124, jan. 1956.

CROTEAU, W. *et al.* Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16569–16575, 14 jul. 1995.

CROZATIER, B. *et al.* Species differences in myocardial beta-adrenergic receptor regulation in response to hyperthyroidism. **Circulation research**, v. 69, n. 5, p. 1234–1243, nov. 1991.

CUNNINGHAM, B. A. *et al.* “Spot 14” protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 8, n. 9, p. 815–825, set. 1998.

DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. F. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 176–188, 2008.

DE VIVO, A. *et al.* Thyroid function in women found to have early pregnancy loss. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 20, n. 6, p. 633–637, jun. 2010.

DIMITRIADIS, G. *et al.* Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans. **The American journal of physiology**, v. 248, n. 5 Pt 1, p. E593–601, maio 1985.

DIMITRIADIS, G. *et al.* The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. **European journal of clinical investigation**, v. 27, n. 6, p. 475–483, jun. 1997.

DIMITRIADIS, G. *et al.* Restoration of early insulin secretion after a meal in type 2 diabetes: effects on lipid and glucose metabolism. **European journal of clinical investigation**, v. 34, n. 7, p. 490–497, jul. 2004.

DIMITRIADIS, G. D. *et al.* Effects of hypothyroidism on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in the soleus muscle of the rat. **The Biochemical journal**, v. 257, n. 2, p. 369–373, 15 jan. 1989.

DIMITRIADIS, G. D.; RAPTIS, S. A. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 109 Suppl 2, p. S225–239, 2001.

DOI, H. *et al.* Remnant lipoproteins induce proatherothrombogenic molecules in endothelial cells through a redox-sensitive mechanism. **Circulation**, v. 102, n. 6, p. 670–676, 8 ago. 2000.

DRAKE, A. J.; WALKER, B. R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. **The Journal of endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 1–16, jan. 2004.

DUBANIEWICZ, A. *et al.* Sensitivity of the soleus muscle to insulin in resting and exercising rats with experimental hypo- and hyper-thyroidism. **The Biochemical journal**, v. 263, n. 1, p. 243–247, 1 out. 1989.

DUNTAS, L. H.; MANTZOU, E.; KOUTRAS, D. A. Circulating levels of oxidized low-density lipoprotein in overt and mild hypothyroidism. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 12, n. 11, p. 1003–1007, nov. 2002.

DUPRÉ, S. M. *et al.* Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2337–2345, maio 2004.

EMMANOUEL, D. S.; LINDHEIMER, M. D.; KATZ, A. I. Mechanism of impaired water excretion in the hypothyroid rat. **The Journal of clinical investigation**, v. 54, n. 4, p. 926–934, out. 1974.

ENTRINGER, S. *et al.* Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 33, p. E513–518, 16 ago. 2011.

EREM, C. *et al.* Plasma lipoprotein (a) concentrations in hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid subjects. **Acta cardiologica**, v. 54, n. 2, p. 77–81, abr. 1999.

FAGUNDES, A. T. S. *et al.* Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. **The British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 5, p. 922–928, nov. 2007.

FELDMAN, J. D.; VAZQUEZ, J. J.; KURTZ, S. M. Maturation of the rat fetal thyroid. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 11, p. 365–383, nov. 1961.

FENZI, G. F. *et al.* Neuropsychological assessment in schoolchildren from an area of moderate iodine deficiency. **Journal of endocrinological investigation**, v. 13, n. 5, p. 427–431, maio 1990.

FERNHOFF, P. M. Congenital hypothyroidism and associated birth defects: implications for investigators and clinicians. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, n. 4, p. 573–574, abr. 1998.

FISHER, D. A. *et al.* Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. **Recent progress in hormone research**, v. 33, p. 59–116, 1976.

FISHER, D. A. *et al.* Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 10, n. 3, p. 229–234, mar. 2000.

FISHER, D. A.; KLEIN, A. H. Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. **The New England journal of medicine**, v. 304, n. 12, p. 702–712, 19 mar. 1981.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, jul. 1998.

FLAIM, K. E.; LI, J. B.; JEFFERSON, L. S. Effects of thyroxine on protein turnover in rat skeletal muscle. **The American journal of physiology**, v. 235, n. 2, p. E231–236, ago. 1978.

FOSS, M. C. *et al.* Peripheral glucose metabolism in human hyperthyroidism. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 70, n. 4, p. 1167–1172, abr. 1990.

FOWDEN, A. L. *et al.* Imprinted genes, placental development and fetal growth. **Hormone Research**, v. 65 Suppl 3, p. 50–58, 2006.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 5, p. 515–526, maio 2004.

FOWDEN, A. L.; SILVER, M. The effects of thyroid hormones on oxygen and glucose metabolism in the sheep fetus during late gestation. **The Journal of Physiology**, v. 482 ( Pt 1), p. 203–213, 1 jan. 1995.

FREEDLAND, R. A.; KREBS, H. A. The effect of thyroxine treatment on the rate of gluconeogenesis in the perfused rat liver. **The Biochemical journal**, v. 104, n. 3, p. 45P, set. 1967.

FREGLY, M. J.; BRIMHALL, R. L.; GALINDO, O. J. Effect of the antithyroid drug propylthiouracil on the sodium balance of rats. **Endocrinology**, v. 71, p. 693–700, nov. 1962.

FREGLY, M. J.; ROWLAND, N. E. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in NaCl appetite of rats. **The American journal of physiology**, v. 248, n. 1 Pt 2, p. R1–11, jan. 1985.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, jun. 1972.

GARCÍA DEL RIO, C. *et al.* Role of the renin-angiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 136, n. 6, p. 656–660, jun. 1997.

GARCÍA-ESTAN, J. *et al.* Involvement of renin-angiotensin system in the reduced pressure natriuresis response of hyperthyroid rats. **The American journal of physiology**, v. 268, n. 5 Pt 1, p. E897–901, maio 1995.

GELFAND, R. A. *et al.* Catabolic effects of thyroid hormone excess: the contribution of adrenergic activity to hypermetabolism and protein breakdown. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 36, n. 6, p. 562–569, jun. 1987.

GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; LE BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 1–16, fev. 2008.

GLINOER, D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 3, p. 404–433, jun. 1997.

GLINOER, D. Iodine supplementation during pregnancy: importance and biochemical assessment. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 106 Suppl 3, p. S21, 1998.

GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and spontaneous abortion. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 2, p. 373–374, ago. 1999.

GLINOER, D. Clinical and biological consequences of iodine deficiency during pregnancy. **Endocrine development**, v. 10, p. 62–85, 2007.

GLUZMAN, B. E.; NIEPOMNISZCZE, H. Kinetics of the iodide trapping mechanism in normal and pathological human thyroid slices. **Acta endocrinologica**, v. 103, n. 1, p. 34–39, maio 1983.

GRILLO, M. A. UREA CYCLE IN THE LIVER OF THE HYPERTHYROID RAT. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 10, p. 259–261, set. 1964.

GRILLO, M. A.; FOSSA, T. Urea synthesis in the liver of the hypothyroid rat. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 13, n. 3, p. 383–386, mar. 1966.

GROSS, G. *et al.* HDL clearance and receptor-mediated catabolism of LDL are reduced in hypothyroid rats. **Atherosclerosis**, v. 66, n. 3, p. 269–275, ago. 1987.

HAPON, M. B. *et al.* Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 371–382, 9 jan. 2003.

HARRIS, A. R. *et al.* The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. **The Journal of clinical investigation**, v. 61, n. 2, p. 441–448, fev. 1978.

HASEBE, M. *et al.* Effects of an anti-thyroid drug, methimazole, administration to rat dams on the cerebellar cortex development in their pups. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 409–414, ago. 2008.

HEIMBERG, M.; OLUBADEWO, J. O.; WILCOX, H. G. Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states. **Endocrine reviews**, v. 6, n. 4, p. 590–607, 1985.

HOLMES, E. W., Jr; DISCALA, V. A. Studies on the exaggerated natriuretic response to a saline infusion in the hypothyroid rat. **The Journal of clinical investigation**, v. 49, n. 6, p. 1224–1236, jun. 1970.

KABADI, U. M.; EISENSTEIN, A. B. Glucose intolerance in hyperthyroidism: role of glucagon. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 50, n. 2, p. 392–396, fev. 1980.

KANAKA-GANTENBEIN, C. Fetal origins of adult diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1205, p. 99–105, set. 2010.

KARBALAEI, N. *et al.* Comparison of the effect of maternal hypothyroidism on carbohydrate metabolism in young and aged male offspring in rats. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 73, n. 1, p. 87–94, fev. 2013.

KIRSTEN, D. The thyroid gland: physiology and pathophysiology. **Neonatal network: NN**, v. 19, n. 8, p. 11–26, dez. 2000.

KLEIN, R. Z. *et al.* Prevalence of thyroid deficiency in pregnant women. **Clinical Endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 41–46, jul. 1991.

KLEIN, R. Z. *et al.* Relation of severity of maternal hypothyroidism to cognitive development of offspring. **Journal of Medical Screening**, v. 8, n. 1, p. 18–20, 2001.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 151, n. 1-2, p. 103–119, 25 maio 1999.

KRAJEWSKI, D. A.; BURMAN, K. D. Thyroid disorders in pregnancy. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 4, p. 739–763, dez. 2011.

KRASSAS, G. E.; POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid function and human reproductive health. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 5, p. 702–755, out. 2010.

LAZARUS, J. H. Thyroid disease in pregnancy and childhood. **Minerva Endocrinologica**, v. 30, n. 2, p. 71–87, jun. 2005.

LEONARD, A. J. *et al.* SHORT COMMUNICATION maternal thyroid dysfunction and c- fos and c- jun expression in rat placenta. **Placenta**, v. 20, n. 8, p. 727–731, nov. 1999.

LI, Y. *et al.* Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. **Clinical endocrinology**, v. 72, n. 6, p. 825–829, jun. 2010.

LISBOA, P. C. *et al.* Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 284, n. 6, p. E1172–1176, jun. 2003.

LITHELL, H. *et al.* Increase of lipoprotein-lipase activity in skeletal muscle during heavy exercise. Relation to epinephrine excretion. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 30, n. 11, p. 1130–1134, nov. 1981.

LOPRESTI, J. S. *et al.* Unique alterations of thyroid hormone indices in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Annals of internal medicine**, v. 110, n. 12, p. 970–975, 15 jun. 1989.

LOUARD, R. J.; BARRETT, E. J.; GELFAND, R. A. Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 44, n. 4, p. 424–429, abr. 1995.

MÄNNISTÖ, T. *et al.* Thyroid dysfunction and autoantibodies during pregnancy as predictive factors of pregnancy complications and maternal morbidity in later life. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1084–1094, mar. 2010.

MARATOU, E. *et al.* Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hypothyroidism. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 160, n. 5, p. 785–790, maio 2009.

MARCHANT, C.; BROWN, L.; SERNIA, C. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 22, n. 3, p. 449–455, set. 1993.

MARCHESINI, G. *et al.* Hepatic conversion of amino nitrogen to urea nitrogen in hypothyroid patients and upon L-thyroxine therapy. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 42, n. 10, p. 1263–1269, out. 1993.

MCCULLOCH, A. J. *et al.* Insulin sensitivity in hyperthyroidism: measurement by the glucose clamp technique. **Clinical endocrinology**, v. 18, n. 4, p. 327–333, abr. 1983.

MECAWI, A. S. *et al.* Ontogenetic role of angiotensin-converting enzyme in rats: thirst and sodium appetite evaluation. **Physiology & behavior**, v. 99, n. 1, p. 118–124, 12 jan. 2010.

MICHAEL, U. F. *et al.* Renal handling of sodium and water in the hypothyroid rat. Clearance and micropuncture studies. **The Journal of clinical investigation**, v. 51, n. 6, p. 1405–1412, jun. 1972.

MITROU, P.; RAPTIS, S. A.; DIMITRIADIS, G. Insulin action in hyperthyroidism: a focus on muscle and adipose tissue. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 5, p. 663–679, out. 2010.

MOKUNO, T. *et al.* Glucose transporter 2 concentrations in hyper- and hypothyroid rat livers. **The Journal of endocrinology**, v. 160, n. 2, p. 285–289, fev. 1999.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGÓN, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 3975–3987, nov. 2000.

MÜLLER, M. J.; SEITZ, H. J. In vivo glucose turnover in hypo- and hyperthyroid starved rat. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, v. 386, n. 1, p. 47–52, jul. 1980.

MÜLLER, M. J.; SEITZ, H. J. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part II: Lipid metabolism in hypo- and hyperthyroidism. **Klinische Wochenschrift**, v. 62, n. 2, p. 49–55, 16 jan. 1984.

MURPHY, C. *et al.* Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1735, n. 3, p. 167–175, 15 ago. 2005.

NEGISHI, T. *et al.* Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. **Behavioural brain research**, v. 159, n. 2, p. 323–331, 30 abr. 2005.

NESS, G. C. *et al.* Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 172, n. 3, p. 1150–1156, 15 nov. 1990.

O'BRIEN, T. *et al.* Lipoprotein compositional changes in the fasting and postprandial state on a high-carbohydrate low-fat and a high-fat diet in subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1345–1351, nov. 1993.

OPPENHEIMER, J. H. *et al.* Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 1, p. 125–132, 1 jan. 1991.

PASCUAL, A.; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochimica et biophysica acta**, 29 mar. 2012.

PATEL, J. *et al.* Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 22, n. 5, p. 164–170, maio 2011.

PEARCE, E. N. What do we know about iodine supplementation in pregnancy? **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3188–3190, set. 2009.

PEKARY, A. E. *et al.* Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 101, n. 1-2, p. R31–35, maio 1994.

PEREZ-ABUD, R. *et al.* Salt sensitivity in experimental thyroid disorders in rats. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 2, p. E281–287, ago. 2011.

PERILLAN, C. *et al.* Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. **Physiology & behavior**, v. 92, n. 4, p. 554–559, 23 nov. 2007.

PICKARD, M. R. *et al.* Maternal hypothyroxinemia influences glucose transporter expression in fetal brain and placenta. **The Journal of endocrinology**, v. 163, n. 3, p. 385–394, dez. 1999.

PUCCI, E.; CHIOVATO, L.; PINCHERA, A. Thyroid and lipid metabolism. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24 Suppl 2, p. S109–112, jun. 2000.

RAZIEL, A. *et al.* The influence of thyroid function on serum lipid profile. **Atherosclerosis**, v. 41, n. 2-3, p. 321–326, fev. 1982.

REPA, J. J.; MANGELSDORF, D. J. Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 557–563, dez. 1999.

RIIS, A. L. D. *et al.* Whole body and forearm substrate metabolism in hyperthyroidism: evidence of increased basal muscle protein breakdown. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1067–1073, jun. 2005.

RIIS, A. L. D. *et al.* Increased protein turnover and proteolysis is an early and primary feature of short-term experimental hyperthyroidism in healthy women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 93, n. 10, p. 3999–4005, out. 2008.

ROBERTS, C. G. P.; LADENSON, P. W. Hypothyroidism. **Lancet**, v. 363, n. 9411, p. 793–803, 6 mar. 2004.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; SUDERA, D. K. Changes in adrenoreceptor density in brown adipose tissue from hyperthyroid rats. **European journal of pharmacology**, v. 114, n. 2, p. 227–229, 15 ago. 1985.

SAINI, V. *et al.* Correlation of creatinine with TSH levels in overt hypothyroidism - A requirement for monitoring of renal function in hypothyroid patients? **Clinical Biochemistry**, 28 out. 2011.

SALA-ROCA, J. *et al.* Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 72, n. 3, p. 643–650, jun. 2002.

SANDLER, M. P. *et al.* The effect of thyroid hormones on gluconeogenesis and forearm metabolism in man. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 56, n. 3, p. 479–485, mar. 1983.

SANTOS, S. O. *et al.* Experimental gestational hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 170, n. 1-2, p. 36–41, 25 set. 2012.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA, L. A., Jr. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiology & behavior**, v. 60, n. 4, p. 1099–1104, out. 1996.

SAUNDERS, J.; HALL, S. E.; SÖNKSEN, P. H. Glucose and free fatty acid turnover in thyrotoxicosis and hypothyroidism, before and after treatment. **Clinical endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 33–44, jul. 1980.

SESTOFT, L. Metabolic aspects of the calorogenic effect of thyroid hormone in mammals. **Clinical endocrinology**, v. 13, n. 5, p. 489–506, nov. 1980.

SHIGESADA, K.; TATIBANA, M. Role of acetylglutamate in ureotelism. I. Occurrence and biosynthesis of acetylglutamate in mouse and rat tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 246, n. 18, p. 5588–5595, 25 set. 1971.

SHIN, D.-J. *et al.* PGC-1 $\alpha$  activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 50, p. 50047–50052, 12 dez. 2003.

SILVA, J. E. Physiological importance and control of non-shivering facultative thermogenesis. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 352–371, 2011.

SILVA, J. E.; BIANCO, S. D. C. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 18, n. 2, p. 157–165, fev. 2008.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 712–713, 20 out. 1983.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, n. 6, p. 2296–2305, dez. 1985.

SMALLRIDGE, R. C. *et al.* Thyroid function inside and outside of pregnancy: what do we know and what don't we know? **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 15, n. 1, p. 54–59, jan. 2005.

SMITH, J. W. *et al.* Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 45–60, jan. 2002.

SMYTH, P. P. *et al.* Assessment of goiter in an area of endemic iodine deficiency. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 9, n. 9, p. 895–901, set. 1999.

SOLIS, J. C.; VALVERDE, C. [Neonatal hypothyroidism. pathophysiogenic, molecular and clinical aspects]. **Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición**, v. 58, n. 4, p. 318–334, ago. 2006.

ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 7, n. 4, p. 655–668, ago. 1997.

STAELS, B. *et al.* Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. **Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 1144–1152, set. 1990.

STANICKÁ, S. *et al.* Insulin sensitivity and counter-regulatory hormones in hypothyroidism and during thyroid hormone replacement therapy. **Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC**, v. 43, n. 7, p. 715–720, 2005.

SWENNE, I. Hypothyroidism in the fetal and neonatal rat does not impair the insulin secretory response to glucose. **Life sciences**, v. 33, n. 22, p. 2207–2211, 28 nov. 1983.

TAN, K. C.; SHIU, S. W.; KUNG, A. W. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 83, n. 8, p. 2921–2924, ago. 1998.

TAYLOR, R. E., Jr; FREGLY, M. J. RENAL RESPONSE OF PROPYLTHIOURACIL-TREATED RATS TO INJECTED MINERALOCORTICOID. **Endocrinology**, v. 75, p. 33–41, jul. 1964.

TESSARI, P. *et al.* Inverse relationship of leucine flux and oxidation to free fatty acid availability in vivo. **The Journal of clinical investigation**, v. 77, n. 2, p. 575–581, fev. 1986.

THORPE-BEESTON, J. G.; NICOLAIDES, K. H.; MCGREGOR, A. M. Fetal thyroid function. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 2, n. 3, p. 207–217, 1992.

USENKO, V. *et al.* The influence of low doses 131I-induced maternal hypothyroidism on the development of rat embryos. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie**, v. 51, n. 3, p. 223–227, maio 1999.

VAIDYA, B. *et al.* Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: Universal screening or targeted high-risk case finding? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 203–207, jan. 2007.

VALDEMARSSON, S. Plasma lipoprotein alterations in thyroid dysfunction. Roles of lipoprotein lipase, hepatic lipase and LCAT. **Acta endocrinologica. Supplementum**, v. 255, p. 1–52, 1983.

VALKONEN, M.; KUUSI, T. Passive smoking induces atherogenic changes in low-density lipoprotein. **Circulation**, v. 97, n. 20, p. 2012–2016, 26 maio 1998.

VARGAS, F. *et al.* Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. **European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 154, n. 2, p. 197–212, fev. 2006.

VENTURA, R. R. *et al.* Effect of chronic oral administration of a low dose of captopril on sodium appetite of hypothyroid rats. Influence of aldosterone treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et al.]**, v. 34, n. 3, p. 407–411, mar. 2001.

VERMIGLIO, F. *et al.* Defective neuromotor and cognitive ability in iodine-deficient schoolchildren of an endemic goiter region in Sicily. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 70, n. 2, p. 379–384, fev. 1990.

VOLPATO, C. B.; NUNES, M. T. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism. **Neuroendocrinology**, v. 74, n. 4, p. 220–226, out. 2001.

WAHREN, J. *et al.* Influence of hyperthyroidism on splanchnic exchange of glucose and gluconeogenic precursors. **The Journal of clinical investigation**, v. 67, n. 4, p. 1056–1063, abr. 1981.

WANG, C. The Relationship between Type 2 Diabetes Mellitus and Related Thyroid Diseases. **Journal of diabetes research**, v. 2013, p. 390534, 2013.

WARNER, M. J.; OZANNE, S. E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **The Biochemical journal**, v. 427, n. 3, p. 333–347, 1 maio 2010.

WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, E.; HABER, R. S. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. **Diabetes**, v. 43, n. 10, p. 1185–1189, out. 1994.

WINTOUR, E. M. *et al.* Programming the cardiovascular system, kidney and the brain-- a review. **Placenta**, v. 24 Suppl A, p. S65–71, abr. 2003.

WLODEK, M. E. *et al.* Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. **Kidney international**, v. 74, n. 2, p. 187–195, jul. 2008.

WOODS, R. J.; SINHA, A. K.; EKINS, R. P. Uptake and metabolism of thyroid hormones by the rat foetus in early pregnancy. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 67, n. 3, p. 359–363, set. 1984.

WU, S.-Y. *et al.* Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 15, n. 8, p. 943–958, ago. 2005.

YANCEY, P. G. *et al.* Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 5, p. 712–719, 1 maio 2003.

YUAN, Q. *et al.* Postnatal pancreatic islet  $\beta$  cell function and insulin sensitivity at different stages of lifetime in rats born with intrauterine growth retardation. **PLoS one**, v. 6, n. 10, p. e25167, 2011.