CAROLINE EMY RODRIGUES SHIBATA

Efeito do hipertiroidismo experimental, induzido em ratas durante a gestação, sobre componentes do Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco da prole

Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Caroline Emy Rodrigues Shibata

EFEITO DO HIPERTIROIDISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO EM RATAS DURANTE A GESTAÇÃO, SOBRE COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CARDÍACO DA PROLE

Dissertação apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profª Drª Maria Luiza Morais Barreto de Chaves

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Shibata, Caroline Emy Rodrigues.
Efeito do hipertiroidismo experimental induzido em ratas durante a gestação, sobre componentes do sistema renina angiotensina cardíaco da prole / Caroline Emy Rodrigues Shibata. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Maria Luiza Morais Barreto de Chaves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Sistema renina angiotensina

Versão do título para o inglês: Effect of experimental hyperthyroidism, induced in female rats during pregnancy, in the components of cardiac renin-angiotensin system in offspring.

Descritores: 1. Hipertiroidismo 2. Sistema renina angiotensina 3. Sistema cardiovascular 4. Ambiente perinatal I. Barretos-Chaves, Maria Luiza Morais II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Anatomia III. Título.

ICB/SBIB0206/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caroline Emy Rodrigues Shibata.

Título da Dissertação: Efeito do hipertiroidismo experimental induzido em ratas durante a gestação, sobre componentes do sistema renina angiotensina cardíaco da prole.

Orientador(a): Maria Luiza Morais Barreto de Chaves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitaria "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **125** nas fls. **63** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Maria Luiza Morais Barretos de Chaves, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "***O sistema renina-angiotensina em prole de mães submetidas a alterações no ambiente perinatal***" do qual participou(aram) o(s) alunos ***Maria Alicia C. Sepúlveda, Gabriela Placoná Diniz, Caroline Emy Rodrigues Shibata e os pesquisadores Marcela Sorelli Carneiro Ramos, Dayane Aparecida Gomes,*** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **19.11.08,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRICIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 02/12/08
REL. N.º 5030

Aos meus pais: Takeo e Conceição. Por vocês, pra vocês com muito amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade e orientação da professora Maria Luiza que aceitou-me como sou e pela confiança absoluta na minha capacidade...”Calma, Carol....vai dar tudo certo!Confia em mim!”.Valeu a pena...Obrigada!

Aos meus amigos-irmãos de laboratório...vocês fizeram a diferença!Não tenho palavras para agradecer tanto carinho e respeito, tanta amizade, colaboração, compreensão...das lágrimas às risadas... Ana Paula, Carol Antunes, Gabi Diniz, Pri Souza, Felix, Day Gomes, Ma Sorelli, Ma Fevereiro, Cris Furstenau, Maria Alicia. Não teria conseguido sem vocês ao meu lado...a cada um de vocês minha gratidão, admiração, respeito, amizade e carinho!Tenho orgulho de fazer parte deste grupo! Agradeço em especial à Carol Antunes. Agradeço sua disposição em aprender ao meu lado e por estar ao meu lado, sempre! Minha total admiração pela pessoa que você é...pela pesquisadora criteriosa, responsável, dedicada, incansável...pelas palavras sábias, pelos momentos de silêncio, pelo ombro amigo...ah!pelas infinitas horas no biotério!! Enfim, obrigada por ser simplesmente a hemiparte, a hemicabeça!!!

Ao Laboratório do Profº Joel Heimann e Miriam Dolnikoff. Obrigada pelas dicas, discussões, sugestões. Aprender com pessoas como vocês é sempre uma honra.

Aos meus colegas de pós graduação com quem dividi histórias, disciplinas e aprendizados. Foi sem dúvida uma grande satisfação!

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial ao Prof° Renato Chopard, Mary, Ana Cláudia e Lincoln.

Ao meu pai, sempre presente, sempre comigo....sempre!Que com muita sabedoria me guia e me dá forças para seguir em frente. À minha mãe que incansavelmente e incondicionalmente me apóia e me incentiva e hoje defende esta dissertação comigo!! As minhas conquistas são fruto do esforço, amor e dedicação de vocês! Amo vocês!

Às minhas irmãs Karen e Carla!! Amigas e conselheiras...tenho muito orgulho de vocês...vocês são exemplos para mim!!

Ao apoio financeiro da FAPESP.

“ Aprendi que todo mundo quer viver em cima da montanha, sem saber que a verdadeira felicidade está na forma de subir a encosta.(...) Aprendi que um homem só tem direito a olhar outro de cima para baixo quando vai ajudá-lo a levantar-se.”

Gabriel García Marquez

RESUMO

Shibata CER. Efeito do hipertiroidismo experimental, induzido em ratas durante a gestação, sobre componentes do Sistema Renina-Angiotensina Cardíaco da Prole. [dissertação (Mestrado em Anatomia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Durante a gestação normal, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) exerce um papel de importância vital no balanço de sais, pressão sanguínea e homeostase da água e, consequentemente, no bem estar da mãe e do feto. Neste sentido, merece destaque não apenas o SRA clássico (descrito inicialmente como um sistema puramente endócrino), mas também, o SRA local, no caso, útero-placentário, onde nos tecidos materno e fetal os vários componentes do sistema se comportam diferentemente, sob regulação e estímulos locais. As perturbações do SRA útero-placentário podem ocasionar hemorragias e redução no fluxo sanguíneo entre mãe e feto, podendo levar, como conseqüência, à pré-eclampsia e crescimento intrauterino retardado. Já é bem estabelecido que disfunções da tireóide, como ocorre no hipertiroidismo, promovem amplas alterações no sistema cardiovascular, agindo sobre contratilidade cardíaca, débito cardíaco, pressão sanguínea e resistência vascular sistêmica. Sabe-se ainda que o hipertiroidismo é responsável por importantes alterações sobre o padrão de comportamento dos vários componentes do SRA no indivíduo adulto, e estas, por sua vez, também estão envolvidas com o aparecimento de alterações cardiovasculares. Assim, o SRA está sob influência direta dos níveis plasmáticos dos hormônios tiroideanos e parece apresentar um importante papel na modulação do trofismo cardíaco induzido pelos mesmos. Embora a associação entre estes dois sistemas endócrinos tenha sido já observada em indivíduos adultos, o conhecimento a respeito dessas interações durante um período crítico de desenvolvimento do sistema cardiovascular, onde o coração representa importante alvo de ação desses dois sistemas hormonais, ainda é escasso. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar na prole o efeito do hipertiroidismo nos componentes do SRA ao longo do período gestacional, destacando que a prevalência desta doença em mulheres que se encontram durante o período gestacional é bastante elevada e suas consequências, no que diz respeito ao sistema cardiovascular da prole, amplamente desconhecidas.

Palavras-Chave: Hipertiroidismo. Sistema Renina-Angiotensina. Sistema Cardiovascular. Ambiente Perinatal.

ABSTRACT

Shibata CER. Effect of experimental hyperthyroidism induced in female rats during pregnancy in the components of cardiac Renin-Angiotensin System of the offspring. [Master thesis (Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo;2010.

During normal gestation, the Renin-Angiotensin System (RAS) exerts an important role in salt balance, blood pressure and water homeostasis and, consequently, in the welfare of mother and fetus. In this sense, it is important to highlight both the classic RAS (initially described as a purely endocrine system), and the local RAS, in this case, the uteroplacental RAS, where the different components of this system in maternal and fetal tissues behave differently, under local regulation and stimuli. The disruption of uteroplacental RAS can cause bleeding and reduced blood flow between mother and fetus and may lead to pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. It's well known that thyroid dysfunction, as occurs in hyperthyroidism, promotes deep changes in cardiovascular system, by acting on cardiac contractility, cardiac output, blood pressure and systemic vascular resistance. Moreover, hyperthyroidism is responsible for important alterations in the expression of distinct components of RAS, which are, in turn, involved with the onset of cardiovascular changes. Thus, the RAS is under direct influence of plasma levels of thyroid hormones and seems to play an important role in the modulation of cardiac tropism induced by these hormones. Although the association between these two endocrine systems have already been observed in adult individuals, the knowledge about this interaction during the critical period of cardiovascular development where the heart is an important target of the action of these two hormonal systems is still poor. Considering the information given above, this study aimed to evaluate the effect of hyperthyroidism in the RAS components on the offspring during the gestational period, considering that this disease is highly prevalent in pregnant women and its consequences upon the cardiovascular system of the offspring are largely unknown.

Key-words: Hyperthyroidism. Renin-Angiotensin System. Cardiovascular System. Perinatal Environment.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

Ang I/I – Angiotensina I/II

AT1 – receptor de Angiotensina II tipo 1

AT2 – receptoer de Angiotensina II tipo 2

D1- desiodase do tipo 1

D2 – desiodase do tipo 2

D3- desiodase do tipo 3

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ED – dia embrionário (do inglês *Embrionic Day*)

HT – Hormônio Tiroideano

ND – dia neonatal (do inglês *Neonatal Day*)

NO – Óxido nítrico

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

SRA – Sistema Renina Angiotensina

T3 – triiodotironina

T4- tiroxina

SUMÁRIO

1 Introdução 11

1.1 Sistema Renina Angiotensina 11

1.2 Sistema Renina Angiotensina Útero Placentário 12

1.3 Sistema Renina Angotensina durante o desenvolvimento fetal 13

1.4 Sistema Renina Angiotensina e Hormônios Tiroideanos 14

2 Hipótese de Trabalho 19

3 Objetivos 20

4 Metodologia 21

4.1 Protocolo Experimental 21

4.2 Análise da Expressão Protéica dos componentes do Sistema Renina Angiotensina por Western Blotting 22

4.3 Dosagem da Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) no tecido cardíaco fetal 23

4.4 Análise Estatística 23

5 Resultados 24

5.1 Padronização do Protocolo Experimental 24

5.2 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre as mães 30

5.3 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre parâmetros morfológicos da prole 32

5.4 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre componentes do Sistema Renina Angiotensina cardíaco da prole 40

5.4.1 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina 40

5.4.2 Expressão Protéica de Componentes do Sistema Renina Angiotensina 41

6 Discussão 44

6.1 Hipertiroidismo experimental: efeitos sobre as mães 45

6.2 Hipertiroidismo experimental: efeitos sobre a prole 46
6.3 Efeitos sobre o Sistema renina Angiotensina Cardíaco 50

7 Conclusões 54

Referências 55

1 Introdução

1.1 Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) possui um papel chave na homeostase cardiovascular de mamíferos através do controle do balanço hidroeletrolítico e controle sobre o tônus vascular (Harris et al., 1997). Além disso, também contribui para o crescimento e diferenciação durante o desenvolvimento ou ainda em alguns estados patológicos (Corvol et al., 1998).

Os principais componentes do SRA clássico foram identificados ainda no início dos anos 70. Fazendo parte deste sistema, foi descrita a renina, uma enzima sintetizada e liberada pelas células justaglomerulares das arteríolas renais aferentes, em resposta a baixa pressão sanguínea e baixa circulação de cloreto de sódio. Tal enzima é capaz de clivar o angiotensinogênio, produzido pelo fígado, à angiotensina I (Ang I), passo limitante para a cascata do SRA. A Ang I, considerada como biologicamente sem função até tempos atrás, é clivada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA), produzida primariamente no endotélio pulmonar, originando a angiotensina II (Ang II) (Irani et al., 2008). Em humanos, sabe-se ainda que a ANG II pode ser gerada a partir da ANG I por outra enzima recentemente descrita, conhecida como quimase. Esta é estocada num complexo macromolecular, em grânulos de secreção de mastócitos. Para se tornar enzimaticamente ativa, o complexo de quimase deve ser liberado de tais grânulos em situações onde há danos vasculares (Fyhrquist et al., 2008).

Dois tipos de receptores da ANG II foram descritos até o momento: AT1 e AT2, ambos pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G. Sabe-se que a maioria das ações da ANG II no indivíduo adulto são deflagradas via receptor AT1. No entanto, o receptor AT2, embora pouco encontrado em tecidos adultos, é altamente expresso no período fetal, sendo crítico durante essa fase do desenvolvimento. As ações decorrentes da ligação da ANG II aos receptores AT2, já bem descritas na literatura, referem-se à inibição do crescimento celular, aumento da apoptose, liberação de óxido nítrico (NO) e vasodilatação, além do envolvimento no desenvolvimento dos tecidos fetais (Fyhrquist et al., 2008; Irani et al., 2008).

Em adição à visão clássica do SRA, a presença de um ou mais RNAs mensageiros (RNAm) dos componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, enzima

conversora e receptores de ANG II) em vários tecidos do organismo, como rins, coração, pulmão, vasos, cérebro e placenta dão suporte à existência do que hoje se preconiza como SRA local (Griendling et al., 1993). Assim, além da presença destes componentes localmente, alguns trabalhos da literatura têm mostrado que diferentes fatores hormonais podem influenciar diretamente os níveis de RNAm destes componentes (Barreto-Chaves et al., 2001; Banday et al., 2005), e provavelmente influenciar na produção local de ANG II. Desta forma, a tendência hoje é aceitar que os componentes circulantes possam ser absorvidos pelos tecidos, mas que compartimentos destes tecidos tenham também capacidade para gerar ANG II com concentrações de substrato e cinéticas diferentes e ainda desconhecidas, de maneira independente do SRA circulante (Dzau, 1988). Além disso, a descrição recente de alguns estudos mostrando a existência de um SRA intracelular, faz do SRA não somente um sistema endócrino, mas também parácrino e intrácrino (Fyhrquist et al., 2008).

1.2 Sistema Renina -Angiotensina Útero- Placentário

A placenta é um órgão altamente especializado, cuja função primária é a de facilitar a passagem de nutrientes, gases e a troca de produtos entre o sangue materno e fetal. Dentre tais produtos podemos citar os componentes do SRA que já têm sido encontrados em muitos tecidos diferentes, incluindo a placenta (Poisner, 1998).

Em humanos, a renina está presente em todas as partes da unidade útero-placentário com maiores concentrações nas membranas fetais (córion e amnion) e decídua (Nielsen et al., 2000). A pró-renina (precursor da renina ativa) é a principal forma de renina útero-placentária. Altas concentrações de angiotensinogênio foram encontradas em homogenatos de placenta, amnion, córion e endométrio de humanos (Nielsen et al., 2000). Entretanto, a presença de RNAm de angiotensinogênio foi encontrada apenas na placenta e decídua de humanos. Assim, acredita-se que pode haver seqüestro de angiotensinogênio da circulação fetal ou maternal, sendo facilitada por suas altas concentrações durante a gravidez.

Altas concentrações ativas de ECA são encontradas no útero de humanos, placenta e membranas fetais (Nielsen et al., 2000). Sabe-se ainda que a atividade de tal enzima aumenta na placenta humana durante o curso da gravidez, enquanto que a expressão do RNAm da ECA, após uma elevação inicial, sofre um decréscimo

próximo ao nascimento. Assim, a unidade útero-placentária possui todos os componentes do SRA necessários para a geração de ANG I e ANG II. Além disso, o útero também contém catepsina D e quimase, indicando que vias alternativas para a geração de ANG II possam existir independentemente da renina e da ECA (Nielsen et al., 2000).

Com relação aos receptores AT1 e AT2, estes já foram identificados na placenta e nas membranas fetais de humanos, coelhos, ratos e vacas. O receptor AT1 é o predominantemente encontrado na placenta de humanos, embora o receptor do tipo AT2 também já tenha sido identificado nesse órgão, mas em pequenas quantidades. A expressão gênica e protéica de tal receptor aumenta a partir do primeiro trimestre e alcança os níveis mais altos nas proximidades do parto (Nielsen et al., 2000). No endométrio humano, o receptor AT2 é o predominante (Ahmed et al., 1995; Saridogan et al., 1996), sendo que sua expressão gênica e protéica é regulada negativamente durante a gravidez, possivelmente pela ação dos esteróides sexuais (De Gasparo et al., 1994; Mancina et al., 1996; Matsumoto et al., 1996; Cox et al., 1993).

Múltiplos efeitos da ANG II na unidade útero-placentária já foram descritos até o momento, e há evidências de complexas interações do SRA com outros importantes sistemas regulatórios locais envolvidos no processo de placentação. Dessa forma, o principal papel fisiológico do SRA placentário é o de promover uma fina modulação no controle da homeostasia tecidual, sendo que, perturbações nessas interações podem levar então a consequentes patologias na prole (Nielsen et al., 2000).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina durante o desenvolvimento fetal

As respostas fisiológicas geradas pela ligação da ANG II aos seus receptores, principalmente do tipo AT1, já são bem caracterizadas em adultos. Entretanto, há menos informações sobre a fisiologia do SRA no desenvolvimento fetal, ainda que todos os componentes de tal sistema sejam precocemente detectados e ativos durante essa fase do desenvolvimento (Harris et al., 1997; Tufro-Mcreddie et al., 1993).

Com relação à renina, esta atinge seus níveis mais elevados durante o período fetal, quando comparados àqueles observados durante qualquer outro período da vida. Tal evento pode ser resultado tanto do aumento propriamente dito

de sua síntese e secreção, como também da diminuição de sua degradação e/ou menor distribuição. Neste sentido, muitos estudos já demonstraram aumento da meia-vida da renina precocemente no desenvolvimento fetal (Harris et al., 1997; Hackenthal et al., 1990).

Durante essa fase, a ANG II, um dos principais peptídeos efetores desse sistema, estimula a expressão de fatores de crescimento e de proto-oncogenes relacionados ao crescimento e/ou desenvolvimento do embrião (Naftilan et al., 1990; Raizada et al., 1993).

A abundância e a larga distribuição dos receptores de ANG II (AT1 e AT2) nos tecidos fetais, muitos deles em sítios nos quais se encontram completamente ausentes no indivíduo adulto, como pele, músculo esquelético e tecidos mesenquimais, denotam a importância crítica que esse sistema apresenta durante a organogênese (Zemel et al., 1989; Robillard et al., 1994). Além disso, paralelamente à vasta distribuição dos componentes do SRA, o fato das concentrações plasmáticas de ANG II diferirem tão significativamente entre mãe e feto ao longo do período embriológico (Wilkes et al., 1985), apontam para a formação da ANG II em um ou mais sítios fetais, como ocorre com o compartimento placentário, dando outra dimensão à importância do sistema renina-angiotensina local.

1.4 Sistema Renina-Angiotensina e Hormônio Tiroideano

O papel e a importância dos hormônios na regulação do crescimento fetal e no desenvolvimento de tecidos já estão bem estabelecidos na literatura. A ablação de glândulas endócrinas dos fetos, ou ainda a administração de hormônios na prole ou na mãe, mostraram que os hormônios afetam o crescimento e a diferenciação *in utero* (Fowden, 1995; Efstratiadis, 1998). Além disso, sabe-se que os hormônios podem alterar o crescimento fetal de maneira direta, através da modulação de genes, ou ainda indiretamente, através de mudanças no crescimento placentário, metabolismo fetal e/ou na produção de fatores de crescimento e outros hormônios pelo tecido feto-placentário (Fowden et al., 2001; Fowden et al., 2005).

Nessa linha, os hormônios tiroideanos (HTs) têm papel fundamental durante o desenvolvimento de diferentes tecidos e órgãos fetais, podendo agir diretamente nos tecidos placentários modificando o metabolismo, diferenciação e desenvolvimento. Assim, sabe-se que a glândula tireóide surge, em ratos, por volta do 9° dia de

gestação (Fisher et al. 1981), secreta dois principais produtos hormonais: T4 ou tiroxina e T3 ou triiodotironina, sendo este último considerado como a forma ativa do hormônio, uma vez que apresenta atividade biológica no mínimo cinco vezes maior que a do T4. A maior parte do T3 circulante é resultante da ação de enzimas – desiodades - sobre o T4, conforme ratificado por Nunes (2003), sendo estas, portanto, enzimas críticas para os efeitos biológicos mediados pelos HTs. Neste sentido, três isoformas de enzimas desiodases já foram descritas, D1, D2 e D3 (desiodases do tipo I, II e III, respectivamente). A D1 é responsável pela conversão de T4 a T3, T4 a T3 reverso (T3r) e T3 a T2. A D2, por sua vez, converte majoritariamente T4 a T3, além de T3r a T2. Por fim, a D3 é a principal inativadora dos hormônios tiroideanos, uma vez que converte T4 a T3r e T3 a T2 (Bianco et al., 2002) (Figura 1).

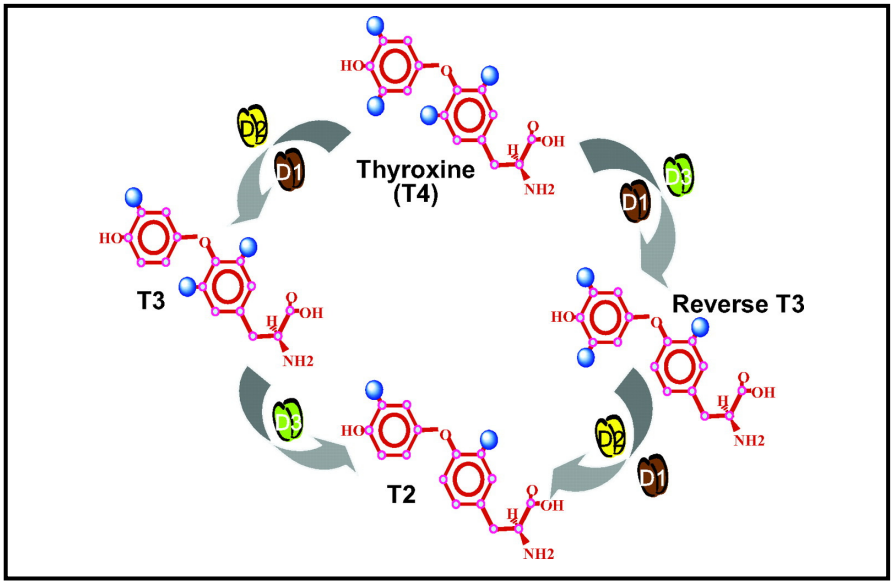

Figura 1: Esquema representativo da desiodação promovida pelas enzimas D1, D2 e D3 e seus respectivos substratos.
FONTE: Gereben et al.(2008).

Classicamente, a placenta humana foi considerada impermeável ao hormônio tiroideano de origem materna (Steele et al., 1972; Ballard, 1986). Entretanto, evidências em *ex vivo* indicam que tanto o T3 como o T4 são transportados da mãe para o feto. Neste sentido, Vulsma e colaboradores, ao final dos anos 80, publicaram a evidência mais conclusiva a respeito do transporte de hormônio tiroideano materno-fetal, uma vez que detectaram a presença de T4 circulante em fetos atiroideos (Chan et al., 2009). Sabe-se que, tanto em ratos como em humanos, a

mãe fornece todo o hormônio necessário antes do início da função tiroideana fetal. Desta forma, os HTs encontrados na placenta, membranas, cavidades e tecidos embrionários jovens são de origem materna (Obregon et al., 1978; Morreale de Escobar et al., 1985, 1993).

Como já citado anteriormente, a placenta humana parece ser bastante sensível a alterações hormonais, o que não é exclusivo para tal órgão, mas, ao mesmo tempo, pode ser determinante ao desenvolvimento normal do feto. Tanto D2 como D3 são expressas na placenta humana, sendo a última o subtipo predominante, com nível de atividade aproximadamente 200 vezes maior que a de D2 (Koopdonk-Kool et al., 1996).

Basicamente, na gestação em humanos, tanto T3 como T4 maternos ultrapassam a membrana apical (face materna) e a membrana basolateral (face fetal) do sincíciotrofoblasto (parte materna da placenta) e/ou a membrana plasmática do citotrofoblasto (parte fetal da placenta). Portanto, durante este percurso, tais hormônios podem ou não sofrer a ação das desiodases (localizadas no citoplasma celular) e, finalmente, alcançar a circulação fetal através dos transportadores de HT. (Figura 2).

De modo geral, apesar da grande importância dos hormônios tiroideanos durante o desenvolvimento fetal como um todo, é no sistema nervoso central (SNC) que se concentra o maior número de estudos descritos na literatura, em decorrência das numerosas evidências de cretinismo observado nessas circunstâncias (Morreale De Escobar et al., 2000). No entanto, tanto concentrações insuficientes de T3 como também a exposição prematura do embrião a elevados níveis de hormônio tiroideano podem ser deletérias aos diferentes sistemas, resultando em desenvolvimento anormal e, até mesmo, em morte (Morreale De Escobar et al., 2000).

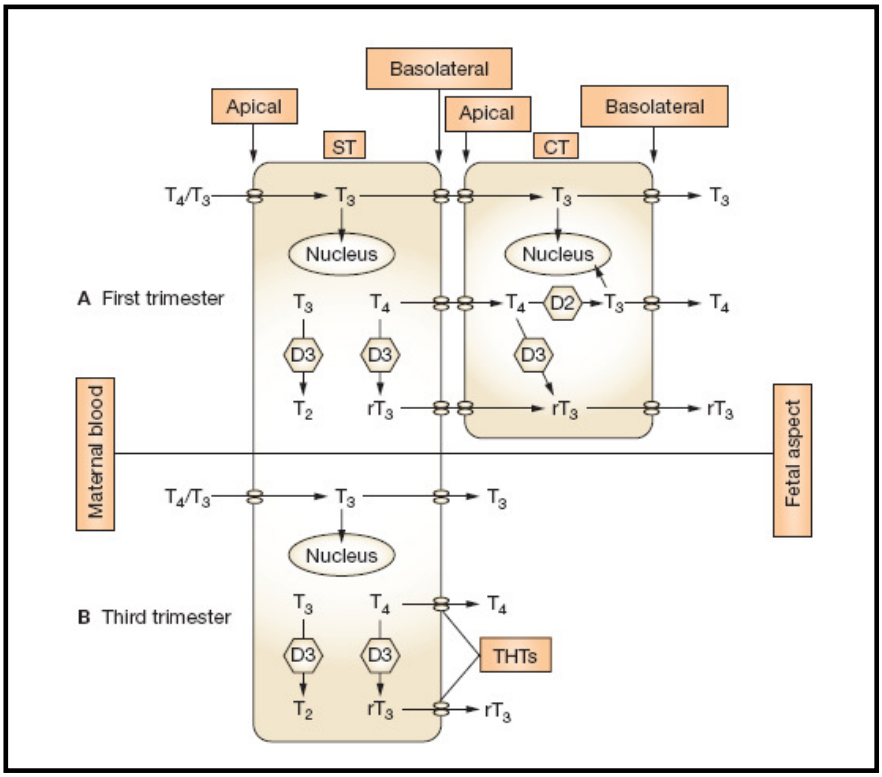

Figura 2: Esquema representativo do transporte de hormônios tiroideanos (T3, T4 e T3 reverso - rT3) pela placenta durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação em humanos. ST, sinciciotrofoblasto (parte materna da placenta); CT, citotrofoblasto (parte fetal da placenta); THT, transportadores de hormônios tiroideanos.
FONTE: Chan et al.(2009).

Sabe-se ainda que o hipertiroidismo gestacional é representado principalmente pela Doença de Graves, uma doença autoimune, caracterizada pela produção de anticorpos (TRAb). Estes, ao se ligarem ao receptor de hormônio tireotrófico (TSH), passam a ativá-lo, o que resulta na indução do crescimento e da função da glândula tiróide, a qual passa a produzir quantidades maiores de hormônios tiroideanos (Andrade et al., 2001). Esta doença, mesmo não sendo muito freqüente na população mundial (0,2%), necessita de uma intervenção multidisciplinar, uma vez que seu tratamento pode levar ao mesmo tempo a complicações maternas, fetais ou ainda neonatais (Rodien et al., 2005). Assim, tão logo seja detectada na mãe, deve-se iniciar imediatamente o tratamento, uma vez que o estado tireotóxico pode desencadear rapidamente alterações maternas e fetais das mais diversas, como taquicardia, insuficiência cardíaca, retardo no crescimento, mobilidade fetal aumentada e maturação óssea acelerada (Radetti et al., 2002).

Alguns trabalhos de nosso grupo têm mostrado que componentes do SRA são significativamente alterados em corações de ratos Wistar adultos, quando em situações de aumento (Anjos-Ramos et al., 2006; Diniz et al., 2007; Carneiro-Ramos et al., 2010) ou diminuição (Carneiro-Ramos et al., 2007) dos níveis plasmáticos dos hormônios tiroideanos. Estas alterações, na maioria das vezes, são acompanhadas por mudanças que afetam desde o aspecto estrutural do tecido cardíaco (Hu et al., 2005; Carneiro-Ramos et al., 2006) como funcionalmente, modificando, por exemplo, parâmetros hemodinâmicos (Hu et al., 2003). Ainda, corroborando com esta interação entre SRA e hormônios tiroideanos, Kobori e colaboradores demonstraram que o SRA local possui um papel primário no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca no hipertiroidismo, a qual ocorre independentemente da ação do sistema nervoso simpático (Kobori et al., 1997).

Com base nos dados apresentados e levando ainda em consideração a interação existente desses dois sistemas hormonais (SRA e hormônios tiroideanos) na modulação da atividade cardiovascular no adulto, a qual vem sendo amplamente estudada pelo nosso grupo, torna-se clara a necessidade e a importância do conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos na modulação dos componentes do SRA em situações de hipertiroidismo, durante o período gestacional.

2 Hipótese do trabalho

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que tecidos ou sistemas podem ser programados *in utero*, durante os períodos críticos do desenvolvimento, respondendo de maneira adaptativa às variações do ambiente perinatal. Tal fenômeno, conhecido classicamente como programação fetal, pode gerar, ao longo da vida do indivíduo, conseqüências adversas às funções de órgãos e tecidos sendo, portanto, determinante do fenótipo adulto. Além disso, sabe-se que o crescimento intrauterino, caracterizado por sua dinâmica e complexidade, necessita da interação materno-fetal ideal para que ocorra de maneira adequada. Quaisquer distúrbios no aporte de nutrientes, oxigênio e hormônios durante este período crítico do desenvolvimento estão associados, em indivíduos adultos, a um aumento na incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas, entre outras. Neste sentido, acredita-se que mecanismos epigenéticos estão envolvidos com tais programações, embora o conhecimento a cerca de tais fatores ainda sejam escassos.

Considerando que a expressão dos componentes do SRA ao longo do período fetal é crítica e que hormônios, tais como os hormônios tiroideanos, são capazes de regular o crescimento e o desenvolvimento de cada tecido fetal, influenciando inclusive o padrão de expressão de genes envolvidos no SRA, a hipótese de nosso trabalho é que esta interação possa ser absolutamente crítica durante o ambiente perinatal e possa ter como conseqüência possíveis alterações sobre a prole, as quais podem ser de extrema significância funcional.

3 Objetivos

Diante da hipótese aventada anteriormente, este trabalho tem como objetivo principal o de avaliar o efeito do hipertiroidismo, induzido na mãe, durante o período gestacional, no comportamento de componentes do SRA no coração da prole, em diferentes fases do desenvolvimento.

Para tanto serão realizadas:

- Implantação e caracterização do modelo experimental proposto;
- Dosagem da atividade da ECA no coração;
- Quantificação da expressão protéica da ANG I/II e dos receptores de ANG II, AT1 e AT2.

4 Metodologia

4.1 Protocolo experimental

Ratas Wistar com 12 semanas de idade foram acasaladas com machos Wistar adultos e, após a verificação de espermatozóides em lâmina de esfregaço vaginal, tomou-se tal dia como o início da fase gestacional (ED0). As fêmeas dos dois grupos experimentais (controle e hipertiroideo) foram acondicionadas individualmente em gaiolas de plástico, em ambiente mantido a temperatura de 25 °C, com ciclo claro-escuro fixo de 12 horas, recebendo água potável *ad libitum*. Para a indução ao hipertiroidismo perinatal inicialmente utilizou-se o protocolo já descrito previamente por Evans et al. (2002). Assim, as ratas receberam o implante na região dorsal, abaixo da pele, de bombas osmóticas de liberação contínua (Alzet, modelo 2002: 0,5ul/h por 14 dias), infundindo L-thyroxine (T4 – SIGMA) (grupo hipertiroideo) ou solução veículo (grupo controle).

Embriões com 18 e 20 dias (ED18 e ED20, respectivamente) foram retirados após cesariana, pesados e processados para coleta dos tecidos. Animais neonatos com 1 dia (ND1) foram pesados e sacrificados por decapitação. Coração e plasma de todos os animais (ED18, ED20, ND1) foram retirados, pesados e congelados para posterior análise da expressão gênica e protéica dos componentes do SRA e dosagem hormonal, respectivamente (Figura 3). Todos os fetos e neonatos foram escolhidos aleatoriamente, não tendo sido diferenciados os machos das fêmeas.

Em todos os grupos experimentais o estado tiroideo materno foi avaliado através da determinação dos níveis de T3 total e T4 total, por radioimunoensaio.

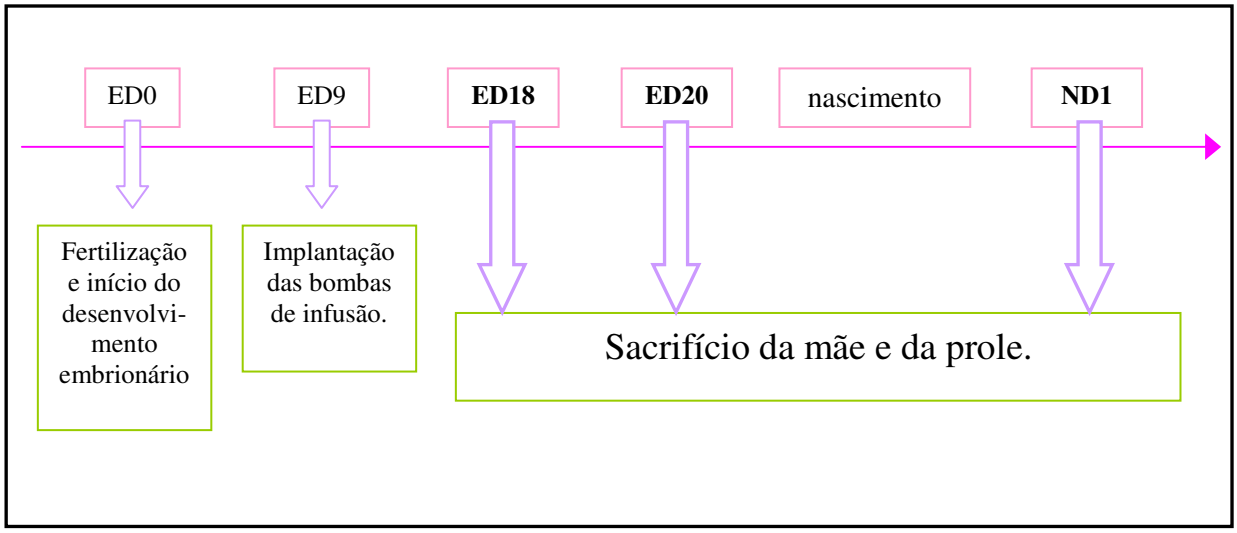

Figura 3. Representação da linha do tempo, com os principais acontecimentos durante o período experimental, desde o início da gravidez (ED0) até o primeiro dia pós natal (ND1).

4.2 Análise da Expressão Protéica dos componentes do SRA por Western Blotting

Amostras de tecido cardíaco fetal dos diferentes grupos experimentais foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração protéica (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS, 0,1 ml inibidor de proteinase [SIGMA]). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Quantidades iguais de proteína de cada uma das amostras (50ug) foram misturadas a um tampão de sódio dodecilsulfato (SDS), aplicadas aos *slots* de um gel SDS-PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 10% e submetidas à eletroforese. Após este processo, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos primários policlonais adicionados à solução de TBST. A seguir os *blots* foram lavados e incubados com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP). O complexo antígeno-anticorpo é visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, UK). A seguir os *blots* foram expostos a filmes de raios-X (Agfa, Argentina ou AmershanBiosciences, UK) e as quantificações das bandas realizadas através do programa Scion image for Windows (Scion Corporation, USA).

4.3 *Dosagem da atividade da ECA no tecido cardíaco fetal*

A prole de mães submetidas ao hipertiroidismo gestacional e de mães eutiroideas foi sacrificada por decapitação no 18° e 20° dia gestacional (ED18 e ED20, respectivamente) e no primeiro dia pós natal (ND1). O coração de cada animal foi coletado e armazenado a -80 °C até as amostras serem processadas. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em tampão borato com sacarose na proporção de 100mg de tecido para 1 mL de tampão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 15 minutos a 1000 rpm e os sobrenadantes separados e armazenados a -80 °C até o seu processamento final. A atividade da enzima foi determinada em 10 ul do sobrenadante, conforme descrito previamente (Oliveira et al., 2000). Os sobrenadantes dos homogenatos do coração foram incubados com 490 mL da solução de Hip-His-Leu a 37 °C durante 30min. Esta reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de NaOH 0,34 N. A seguir, acrescentou-se 100 mL da solução de *o*-ftaldialdeído 2%, protegido da luz e em temperatura ambiente. Esta substância liga-se ao produto da reação enzimática, o His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10min, a reação foi interrompida pela adição de 200 mL de HCl 3N, sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi então submetido à leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro usando um comprimento de onda de 365 ηm para excitação e de 495 ηm para emissão. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. A determinação da quantidade de proteína das amostras foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão. A atividade específica da ECA foi expressa em ηMoles de His-Leu/min/mg de proteína da amostra.

4.4 *Análise estatística*

Os resultados obtidos estão expressos como média +/- desvio padrão da média. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0.05$).

5 Resultados

5.3 *Padronização do Protocolo Experimental*

Considerando que o protocolo experimental usado no presente projeto não estava ainda estabelecido em nosso laboratório e, devido ao fato de sua padronização ter demandado uma gama grande de experimentos, bem como um longo tempo de trabalho, optamos por incluir neste subítem da sessão "Resultados" todos os passos realizados ao longo desta etapa, afim de estabelecer as condições ideais para nosso estudo.

Inicialmente, para que o cruzamento das ratas fosse realizado com sucesso foi necessário aprender a técnica de esfregaço vaginal e acompanhar as diversas fases do ciclo estral das ratas. Tal ciclo possui 4 fases muito bem definidas, de acordo com a predominância dos tipos celulares presentes no esfregaço. Na primeira fase – Proestro – há um predomínio de células nucleadas; segue-se a fase de Estro, caracterizada pela presença abundante de células corneificadas. A fase subsequente é a conhecida como Metaestro, onde observa-se a presença de 3 tipos celulares – nucledas, corneificadas e leucócitos. O ciclo encerra-se com o predomínio dos leucócitos, característicos da fase de Diestro (Figura 4).

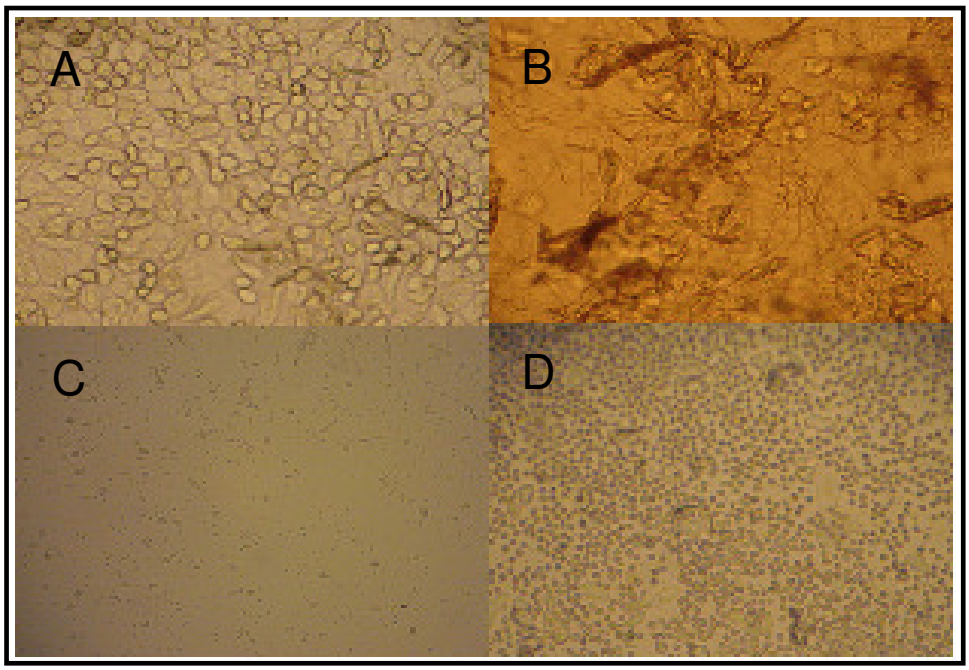

Figura 4: Fases características do ciclo estral das ratas. a) Proestro; b) Estro; c) Metaestro; d) Diestro (aumento 100x).

Uma vez identificadas e caracterizadas as fases componentes do ciclo estral das ratas foi iniciada a etapa seguinte – o acasalamento. As ratas tornam-se mais receptivas ao macho na transição da fase de proestro para estro. Neste período, duas fêmeas e um macho foram mantidos em uma mesma gaiola, durante as 12 horas escuras do ciclo claro/escuro. O esfregaço vaginal para verificação de cópula através da visualização de espermatozóides em lâminas (Figura 5) foi realizado na manhã seguinte a este período.

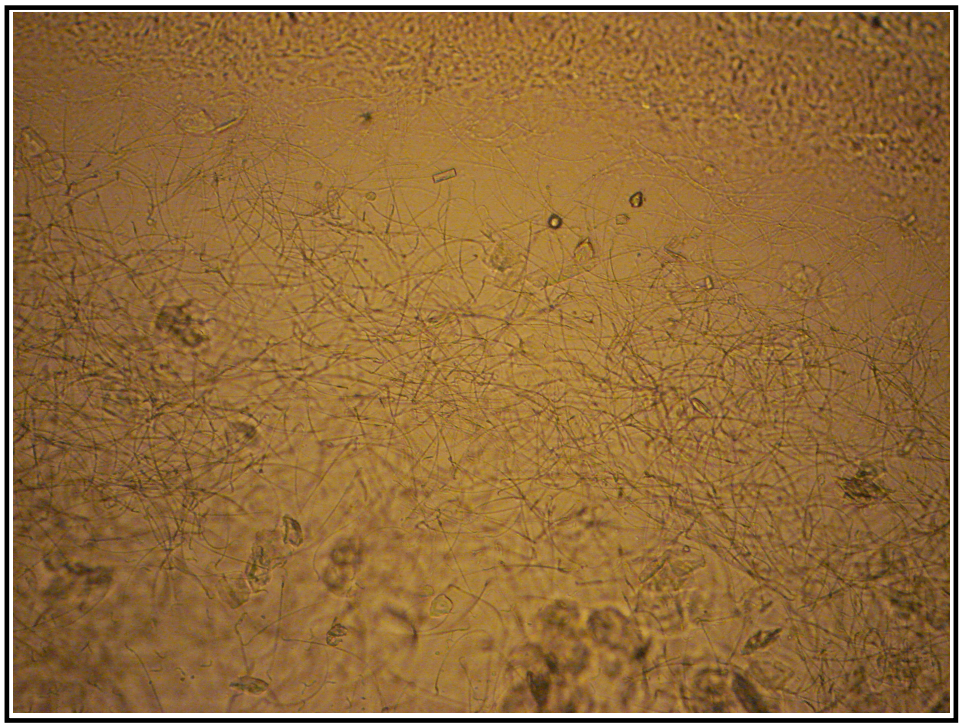

Figura 5: Imagem observada após a ocorrência de cópula, evidenciando a presença de espermatozóides em lâmina de esfregaço vaginal (aumento 100x).

Uma vez confirmada a cópula e, consequentemente, o início do período gestacional (ED0), as ratas foram acondicionadas individualmente e separadas em 3 grupos experimentais: controle, hipertiroideo e sham. A partir do 9° dia de gestação (ED9) as ratas dos grupos hiper e sham foram submetidas à operação de implante das mini bombas osmóticas para infusão contínua de hormônio tiroideano (HT) ou de solução veículo de HT (Figura 6). A escolha do 9° dia de gestação (ED9) para início do tratamento se baseou no fato de trabalhos da literatura apontarem alterações nos níveis séricos dos hormônios tiroideanos como responsáveis em parte pela eficiência do processo de placentação. Em ratos, sabe-se que o período

de implantação ocorre entre o 5° e 6° dias de gestação. Desta forma, tendo em vista a importância que o hormônio tiroideano exerce nesse processo, garantiu-se que o tratamento tivesse início apenas 3 dias após a implantação do embrião no útero (Galton et al., 1999).

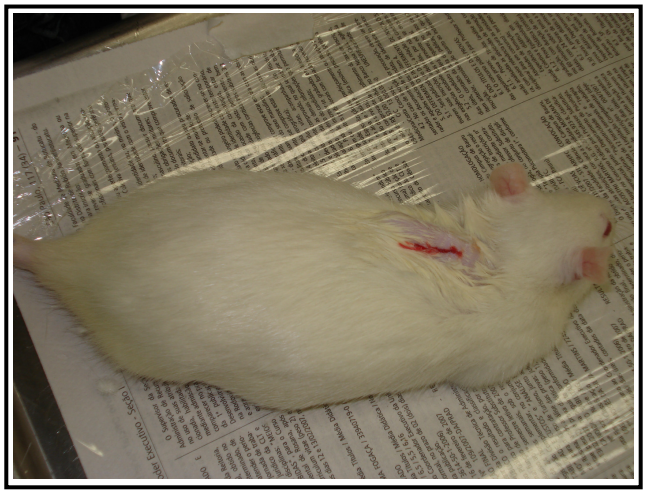

Figura 6: Foto ilustrativa do processo cirúrgico realizado nos grupos sham e hiper. Um pequeno corte foi realizado na região dorsal da rata, seguido do divulsionamento da pele para implante da mini bomba osmótica.

Para escolha da dose ideal a ser utilizada na indução ao hipertiroidismo gestacional, uma curva concentração-resposta para o hormônio tiroideano (T4) foi previamente realizada. Assim, as ratas do grupo hiper receberam os implantes contendo 1, 5, 10, 15 e 25 vezes a dose fisiológica de T4, diluído previamente em solução veículo de NaOH 0,34M. As ratas do grupo sham receberam os implantes das bombas osmóticas contendo apenas a solução veículo de T4. Ao final de 20 dias de gestação os animais foram sacrificados por decapitação.

Para a confirmação do modelo experimental realizou-se a dosagem sérica de T4 total e T3 livre e análise da razão peso do coração/comprimento da tíbia (Tabela 1 e Figura 7). A utilização desta relação já é muito bem estabelecida na literatura visto que o hormônio tiroideano possui ação clássica sobre o trofismo cardíaco em animais adultos (Hu et al*.,* 2005), não alterando o comprimento da tíbia destes animais, pelo menos em período tão curto de tratamento.

Tabela 1 - Dosagens séricas de hormônio tiroideano em ratas prenhas, sacrificadas após 20 dias de gestação.

Grupo	T3 livre (pg/mL)	T4 total (ug/dL)
Controle (n=2)	2,26±0,183	2,30±0,219
Hiper -1X (n=2)	3,04±0,565	3,03±0,629
Hiper – 5X (n=2)	2,79±0,622	2,62±0,006
Hiper – 10X (n=1)	3,20	2,50
Hiper – 15X (n=1)	2,54	1,86
Hiper – 25X (n=2)	2,79±0,021	2,97±0,438

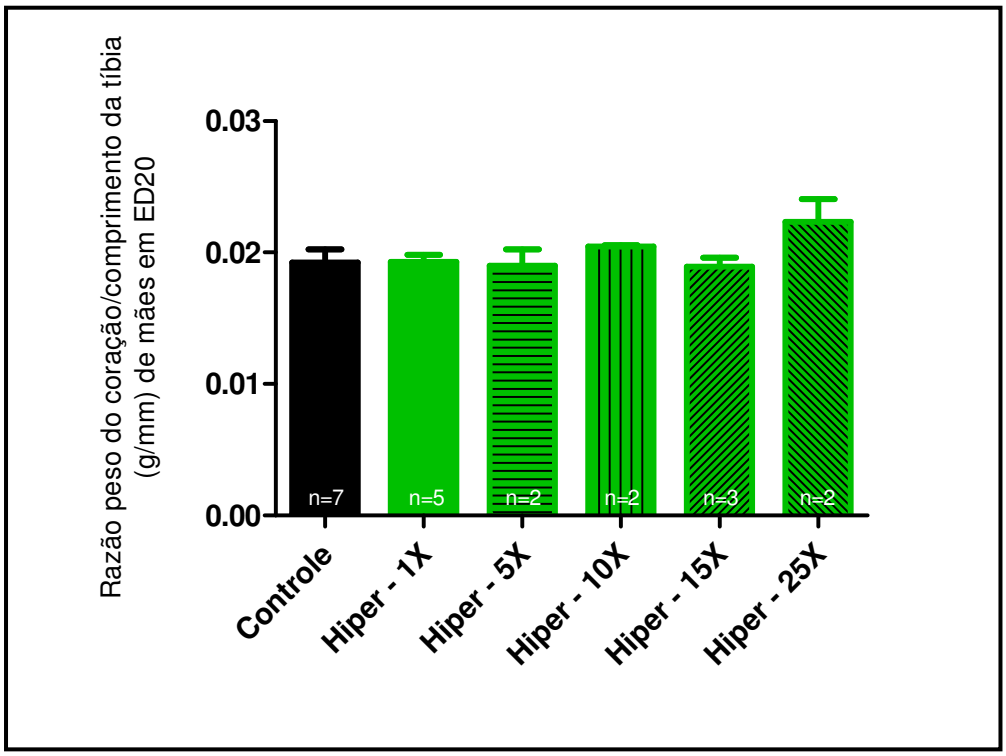

Figura 7: Análise da razão peso do coração/comprimento da tíbia de ratas em ED20 que receberam implante de bombas osmóticas para infusão de diferentes concentrações de HT.

Os dados apresentados revelam que a indução ao hipertiroidismo gestacional através da infusão contínua de T4 por mini bombas osmóticas não foi efetiva, uma vez que os níveis séricos de T4 total e T3 livre nos grupos que receberam diferentes

doses hormonais não diferiram daqueles observados no grupo controle. Além disso, sabendo-se que uma das ações clássicas dos HT sobre o tecido cardíaco é a influência sobre o trofismo de tal órgão, espera-se que, em condições de hipertiroidismo, ocorra hipertrofia cardíaca. Tal hipertrofia pode ser traduzida pelo aumento da razão peso do coração/comprimento da tíbia, não observada em nossos animais. Desta forma, embora tivéssemos nos baseado em trabalho da literatura que se utilizara de tal metodologia para indução ao hipertiroidismo (Evans et al*.,* 2002), a ausência dos efeitos previstos, bem como das alterações séricas de T3 e T4, nos levaram a buscar um outro protocolo de indução à doença. Diante disso, optamos por testar um novo protocolo de indução ao hipertiroidismo gestacional, o qual é realizado por adicionar T4 à água de beber dos animais (Ladenson et al*.,* 1986). Este protocolo vem sendo amplamente utilizado em vários trabalhos da literatura (Araujo et al*.,* 2006, 2008).

Assim, novamente, uma vez confirmado o início do período gestacional (ED0), as ratas foram separadas em 2 grupos experimentais: controle e hipertiroideo. A partir do 9° dia de gestação (ED9) deu-se início ao tratamento. Duas diferentes doses foram testadas com o intuito de escolher a concentração de hormônio a ser administrada. Desta forma, ratas do grupo hiper receberam 12 ou 16 mg T4/L de água, enquanto que o grupo controle recebeu apenas água, sem adição de nenhuma droga. As ratas foram sacrificadas após 18 (ED18) e 20 dias (ED20) de gestação. Para a validação deste novo protocolo experimental realizamos novamente as dosagens séricas de T3 e T4, além da análise do parâmetro de peso do coração/comprimento da tíbia (Tabela 2 e Figura 8).

Tabela 2 - Dosagens dos níveis séricos de T4 total, T4 livre, T3 total de ratas prenhas, dos grupos controle e hiper que receberam 12 ou 16mg de T4/L adicionados à água de beber.

	ED18			ED20		
	Controle (n=3)	Hiper 12mg (n=3)	Hiper 16mg (n=3)	Controle (n=5)	Hiper 12mg (n=5)	Hiper 16mg (n=2)
T4 Total (ug/dL)	36,52 ± 7,94	>206 *	>206 *	20,71 ± 3,86	>206 *	>206 *
T4 Livre (ng/dL)	0,64 ± 0,20	6,61 ±1,63 *	6,40 ±0,82 *	0,34 ± 0,15	6,99 ±1,90 *	7,02 ±0,50 *
T3 Total (ng/dL)	4,82 ± 1,79	16,87 ±1,91 *	18,58 ±1,29 *	5,74 ± 2,82	>20 *	>20 *

*vs controle; p<0,05

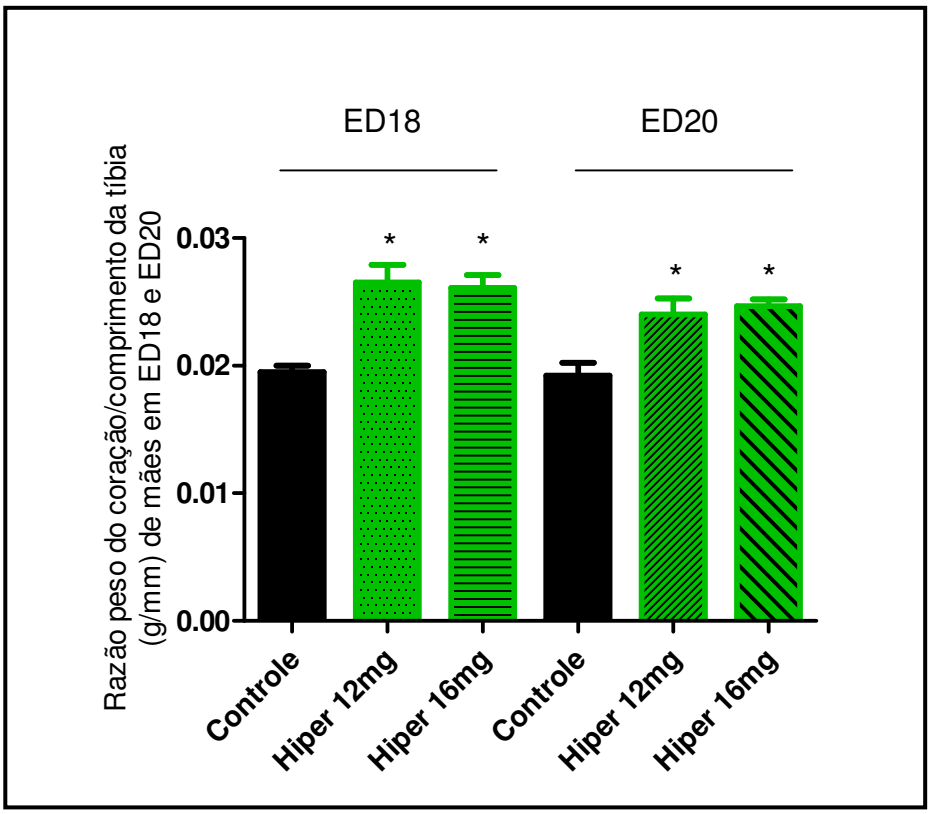

Figura 8: Análise da razão peso do coração/comprimento da tíbia de ratas que receberam T4 na água de beber em ED18 e ED20 (p<0,05;* vs controle).

A dosagem dos níveis séricos de T4 total e livre, e ainda de T3 livre, nas ratas dos grupos hiper com as duas doses (12 e 16 mg), bem como a análise da razão peso do coração/comprimento da tíbia demonstram agora a eficácia do tratamento de indução ao hipertiroidismo mediado pela adição de T4 à água de beber. Uma vez que as duas concentrações de hormônio utilizadas foram efetivas, optamos por usar a menor concentração (12 mg T4/L de água).

5.2 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre a mães

A partir do estabelecimento do protocolo e da dose a ser utilizada na indução ao hipertiroidismo experimental seguimos com os cruzamentos e o sacrifício das ratas, como descrito previamente na sessão que descreve a metodologia utilizada no presente estudo.

Os resultados apresentados a seguir (Figura 9) correspondem aos dados relativos à razão peso coração/comprimento da tíbia das mães, no 18° e 20° dia gestacionais (ED18 e ED20, respectivamente), juntamente com dados obtidos no dia do nascimento (ND1).

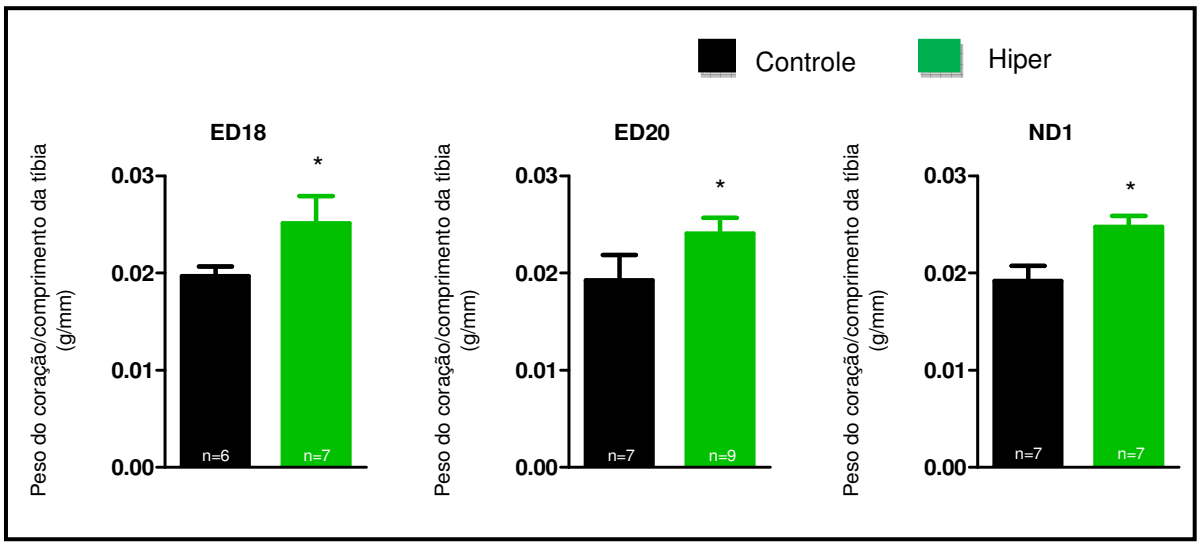

Figura 9: Análise da relação peso do coração/comprimento da tíbia de ratas ED18, ED20 e ND1 controle e submetidas ao hipertiroidismo (*vs controle p<0,05) . O n refere-se ao número de mães de cada grupo experimental.

Observa-se que em todos os períodos gestacionais avaliados, a indução ao hipertiroidismo materno promoveu um significativo aumento da razão peso coração/comprimento da tíbia, indicando o desenvolvimento de uma hipertrofia

cardíaca, normalmente observada no indivíduo adulto sob condições de hipertiroidismo (Figura 9). Ainda, as dosagens dos níveis séricos de hormônio tiroideano (Tabela 3) mostram um aumento significativo de T4 total ($p<0,01$) e de T3 total ($p<0,05$), comprovando o estado de hipertiroidismo gestacional das ratas.

Tabela 3 - Dosagens dos níveis séricos de T4 total e T3 total de ratas prenhas, dos grupos controle e hipertiroideo, sacrificadas em ED20 ou ND1.

	ED20		ND1	
	Controle (n=7)	Hiper (n=7)	Controle (n=9)	Hiper (n=3)
T4 Total (ug/dL)	17,22±5,37	217,14±30,00*	31,45 ± 10,07	215,62±62,69*
T3 Total (ng/dL)	0,65 ± 0,23	3,58±0,76*	1,12 ± 0,40	2,76±0,89*

*vs controle; $p<0,05$

Paralelamente às análises já apresentadas e, tendo em vista os efeitos dos HTs sobre o metabolismo e o sistema reprodutivo, foram avaliados, ao longo do tratamento, outros parâmetros referentes às ratas no período gestacional, expressos na Tabela 4, a seguir.

Tabela 4 - Média do número de fetos por mãe, ganho de peso ao longo da gestação, consumo médio de água e ração ao longo do tratamento.

	ED18		ED20		ND1	
	Controle	**Hiper**	**Controle**	**Hiper**	**Controle**	**Hiper**
Média do número de fetos/mãe	9,33±2,50 (n=6)	12 ± 1,67 (n=7)	9,75±2,21 (n=6)	11±1,58 (n=9)	9,85±1,87 (n=7)	9,42±1,27 (n=5)
Ganho de peso médio durante a gestação (peso final-peso inicial)	71,45±11,88 (n=6)	80,9±14,71 (n=7)	94,08±16,69 (n=6)	102,22±13,21 (n=9)	---------	----------
Consumo médio de água pela mãe (ml/dia)	53,05±9,41 (n=4)	56,20±7,29 (n=4)	45,81±4,57 (n=4)	63,88±5,22* (n=4)	45,59±6,68 (n=3)	60,5±0,97* (n=3)
Consumo médio de ração pela mãe (g/dia)	25,49±2,65 (n=5)	26,65±2,82 (n=5)	22,63±2,82 (n=4)	25,70±2,86 (n=6)	22,89±2,21 (n=4)	27,92±2,47* (n=4)

*vs controle; p<0,05

Os dados mostram que não houve diferença significativa no número médio de fetos por gestação e, embora se observe uma forte tendência ao aumento do ganho de peso das mães durante o período gestacional, esta não chegou a ser significativamente diferente entre os grupos controle e hipertiroideo. Considerando a ação dos HT em aumentar o metabolismo basal, houve, como esperado, um aumento de 30 a 40% no consumo médio de água (mL/dia) de mães hipertiroideas dos grupos ED20 e ND1. Observa-se ainda que há um aumento significativo do consumo médio de ração (mg/dia) nas ratas submetidas ao hipertiroidismo gestacional em ND1.

5.3 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre parâmetros morfológicos da prole

Inicialmente, o peso corpóreo das ninhadas em ED18, ED20 e ND1 foi avaliado e está representado na Figura 10 e Tabela 5. Conforme pode ser observado, os dados revelam que nos períodos gestacionais ED18 e ED20 houve um aumento significativo do peso corpóreo das ninhadas provenientes de mães hipertiroideas.

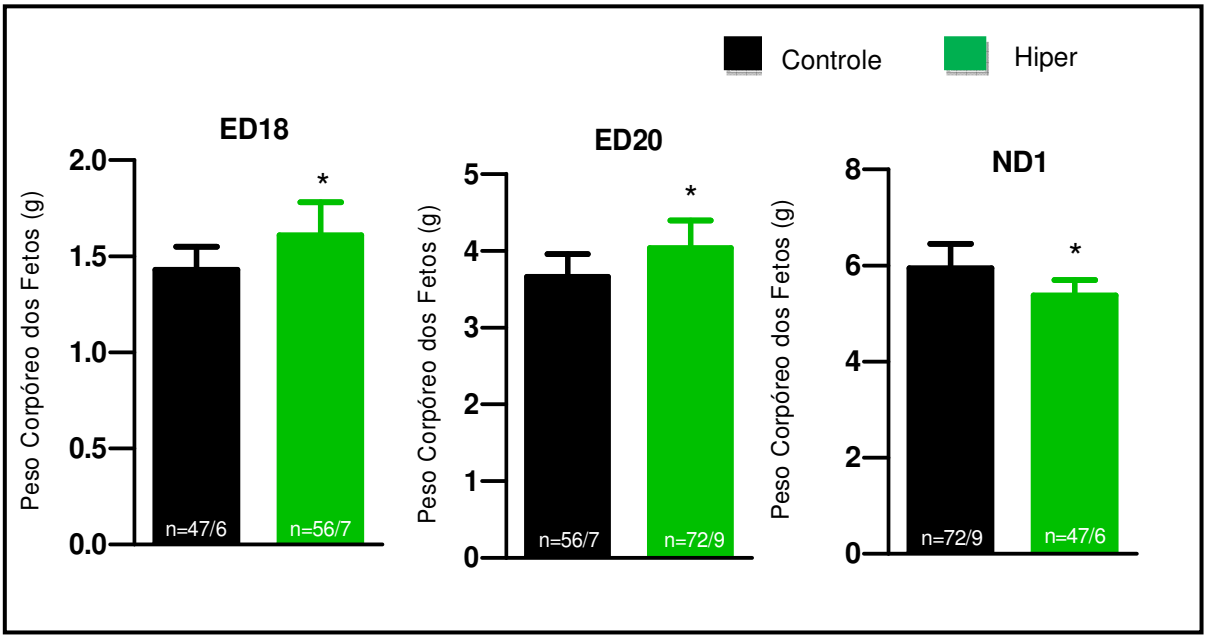

Figura 10: Análise do peso corpóreo da prole de mães eutiroideas e hipertiroideas nos diferentes períodos gestacionais (ED18 e ED20) e no primeiro dia pós-natal (ND1). Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por cada período experimental, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou (*vs respectivo grupo controle; p<0,0001).

Tabela 5 - Média do peso corpóreo de fetos provenientes de mães controle e hipertiroideas nos diferentes períodos avaliados.

	Controle	Hiper
ED18	1,42±0,12 (n=47)	1,608±0,17* (n=56)
ED20	3,65 ± 0,29 (n=56)	4,03±0,36* (n=72)
ND1	5,94 ± 0,50 (n=72)	5,38±0,31* (n=47)

*vc controle; p<0,05

Com o intuito de avaliar se o aumento do peso corpóreo da prole cujas mães eram hipertiroideas poderia ter relação com o tamanho da placenta, este parâmetro foi também avaliado. Como pode ser observado a seguir (Figura 11), apenas as placentas de mães hipertiroideas em ED18 apresentaram um aumento significativo de peso, em relação àquelas do grupo controle. Entretanto, quando se avaliou a relação peso da placenta (PP)/peso corpóreo (PC) observa-se, no grupo hipertiroideo, uma diminuição significativa em ED20 (Figura 12).

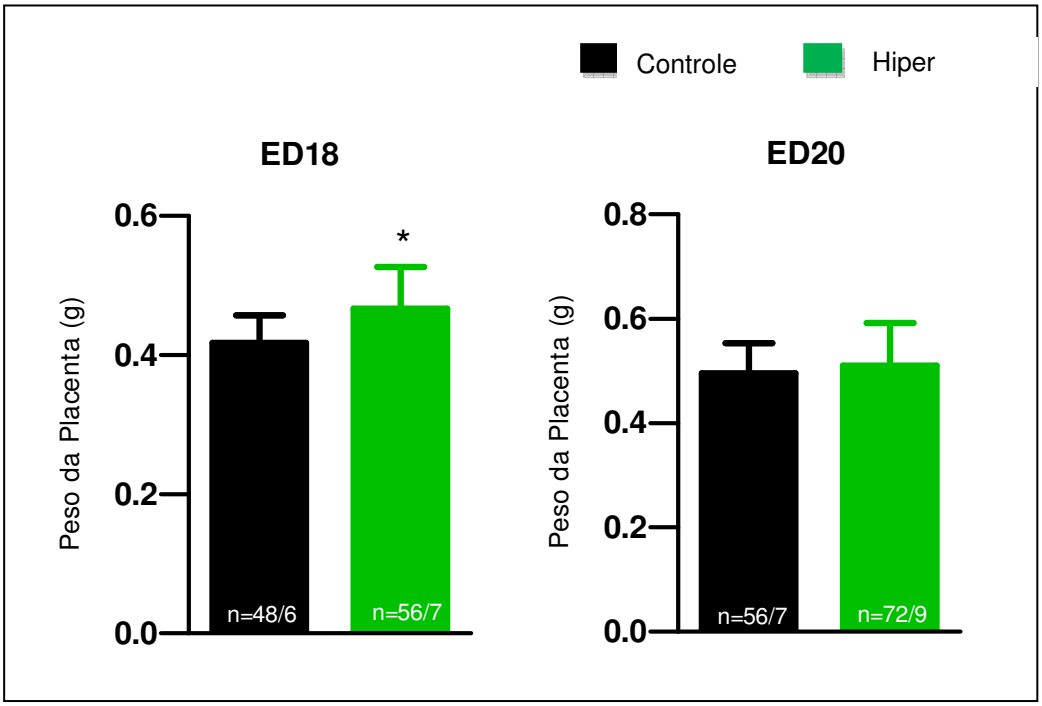

Figura 11: Análise do peso das placentas de mães em ED18 e ED20. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por cada período experimental, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou. (*vs controle; p<0,01).

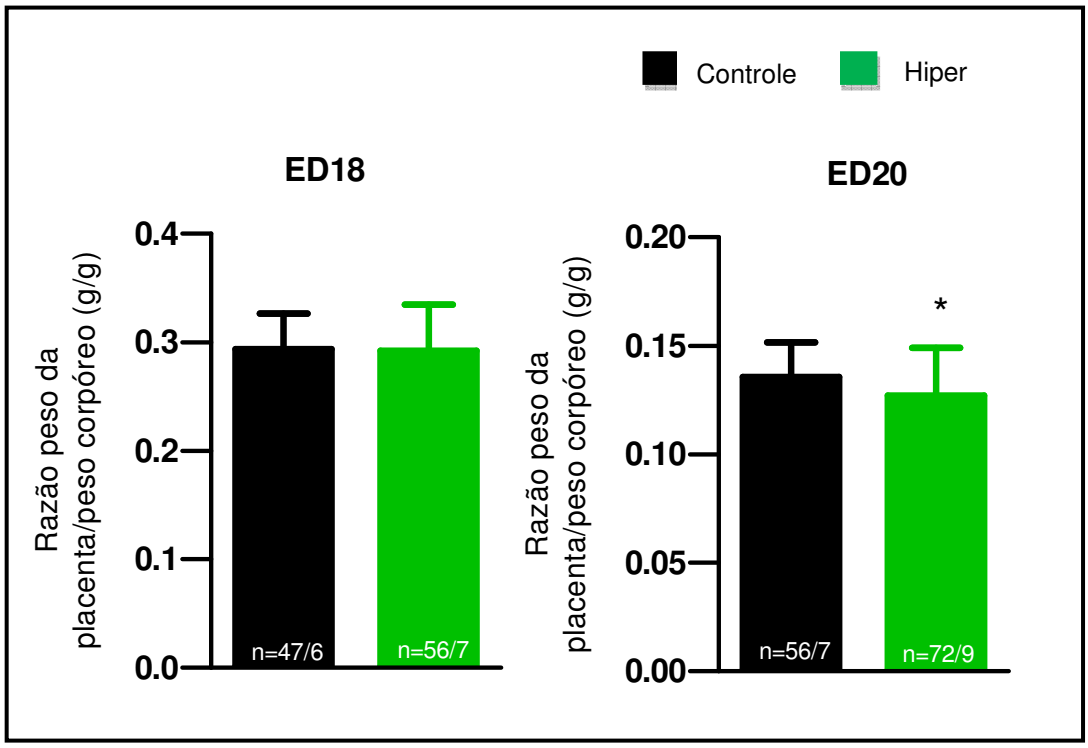

Figura 12: Análise da razão peso da placenta/peso corpóreo. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por grupo, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou. (*vs controle; p<0,01).

Uma vez verificada a influência do hipertiroidismo gestacional no peso corpóreo da prole, o próximo passo foi verificar se o estado tiroideo materno exerceria também influência sobre o tecido cardíaco fetal, como se observa comumente na fase adulta (Figuras 13 e 14). A análise dos dados mostra que, embora se note um aumento significativo do peso cardíaco da prole em ED18 e ED20 (Figura 13), este não se observa em ND1. Com o intuito de observar se o aumento do peso cardíaco ocorrera em função do aumento do peso corpóreo da prole, a razão peso coração/peso corpóreo foi também analisada (Figura 14). Conforme pode ser observado, a partir do 20° dia de gestação a prole proveniente de mães submetidas ao hipertiroidismo gestacional apresentou hipertrofia cardíaca, evidenciando a ação dos HT sobre o tecido cardíaco, independentemente do seu efeito sobre o peso corporal.

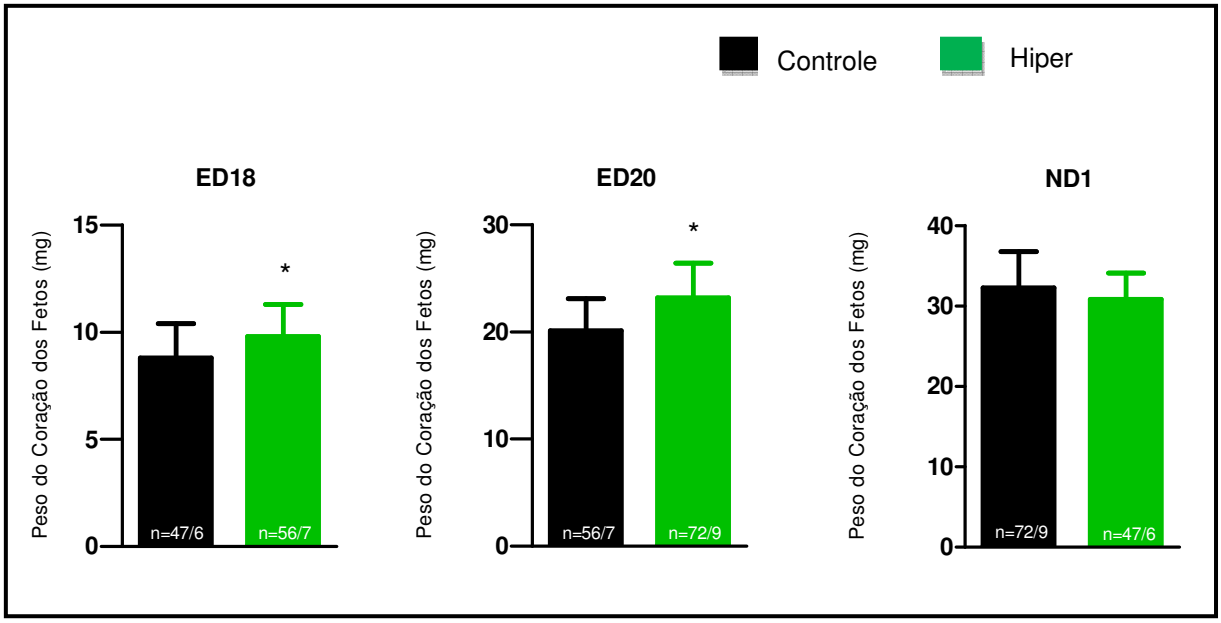

Figura 13: Análise do peso dos corações de proles em ED18, ED20 e ND1 de ratas controle e submetidas ao hipertiroidismo gestacional. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por grupo, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou (*vs controle; p<0,01).

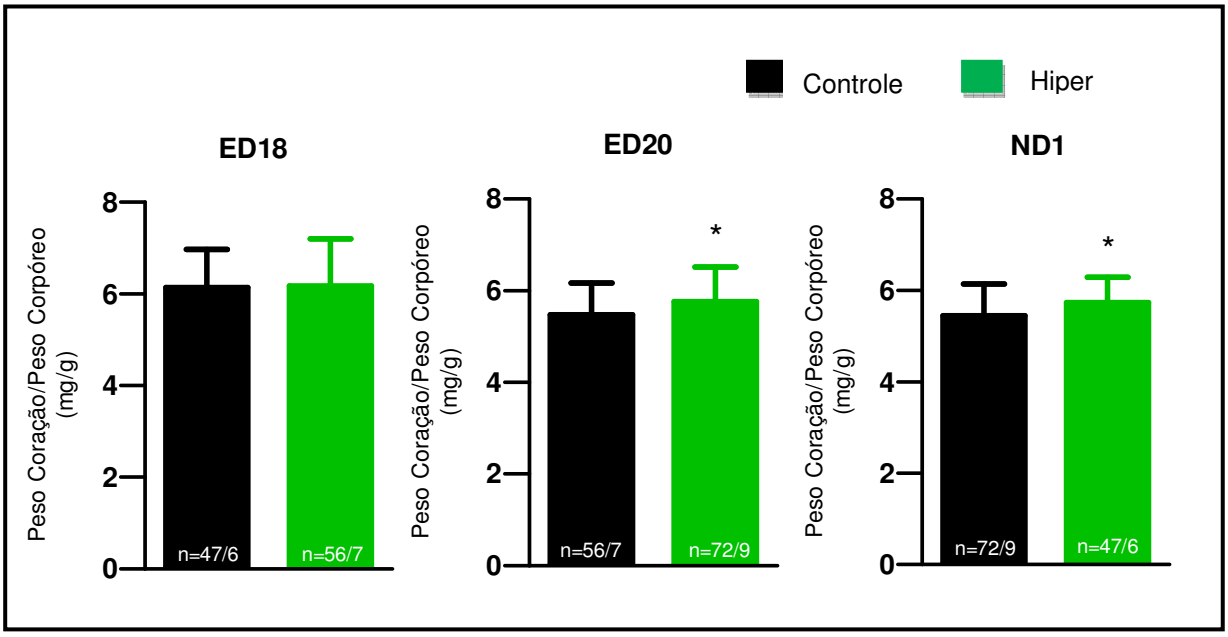

Figura 14. Análise da razão peso do coração/peso corpóreo de proles em ED18, ED20 e ND1 de ratas controle e submetidas ao hipertiroidismo gestacional. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por grupo, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou (*vs controle; p<0,05).

Em seguida, dando continuidade à caracterização da prole e considerando a possível influência do hipertiroidismo gestacional em outros órgãos de excelência, os quais sabidamente são alvo dos hormônios tiroideanos, avaliou-se o peso úmido do rim e pulmão esquerdos de cada feto, bem como a respectiva razão com o seu peso corpóreo (Figuras 15 e 16).

A análise dos dados evidencia que, embora em ED20 tenhamos um significativo aumento do peso renal (Figura 15 A), somente em ND1 se observa uma significativa hipertrofia renal, dada pela razão peso do rim esquerdo/peso corpóreo (Figura 15B).

Em relação ao efeito do hipertiroidismo sobre os pulmões da prole, observa-se que somente em ND1 ocorreu um aumento significativo do peso úmido deste órgão (Figura 16 A). Este aumento se refletiu inclusive na relação com o peso corpóreo, a qual nessa fase também se mostrou significativamente aumentada (Figura 16B). Ainda, embora em ED20 não tivesse sido observada alteração no peso do pulmão, a relação com o peso corpóreo mostrou-se significativamente diminuída nessa fase do desenvolvimento, por efeito do hipertiroidismo.

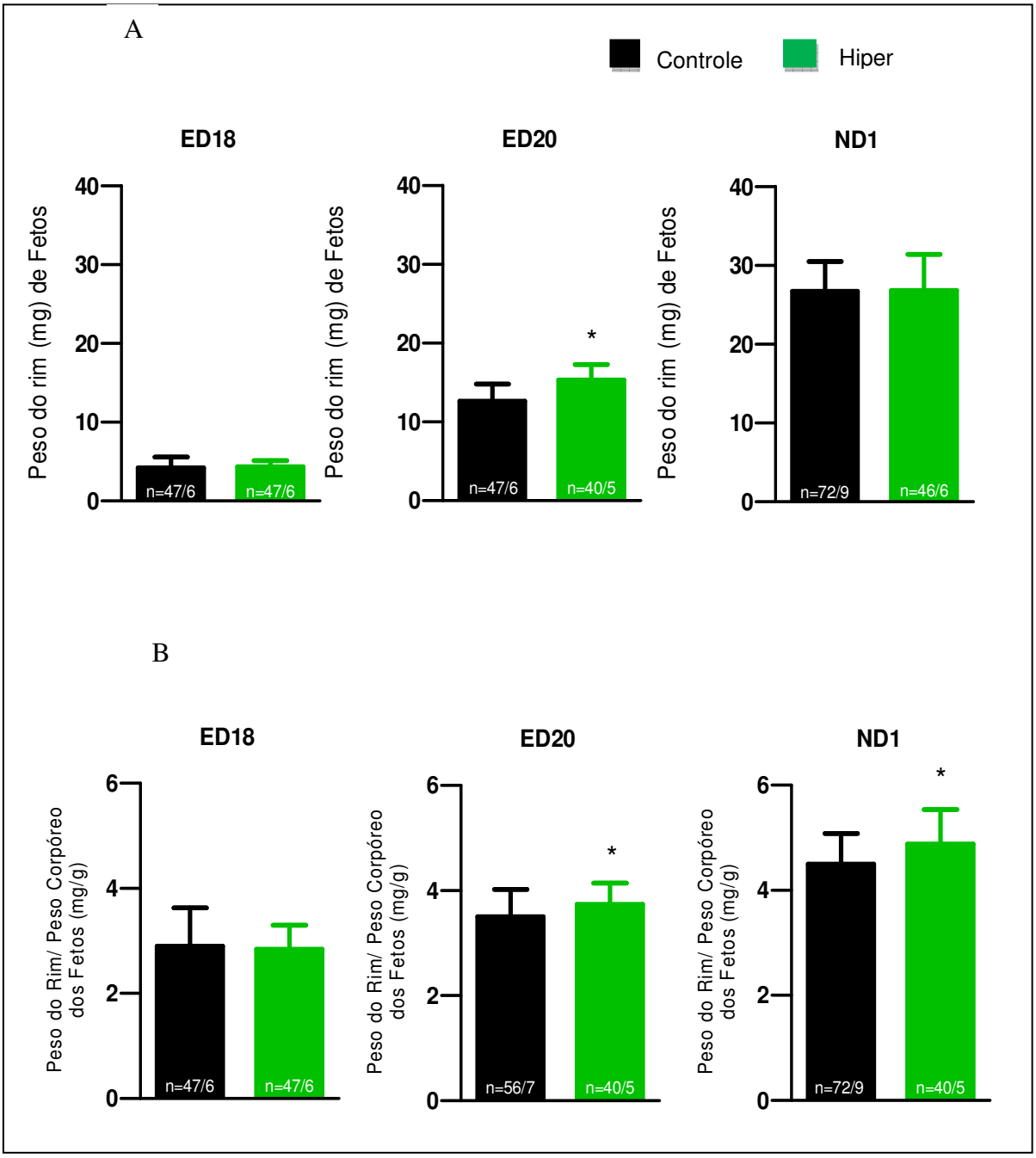

Figura 15: Média do peso úmido do rim esquerdo (A) e razão peso renal/peso corpóreo (B) da prole dos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por grupo, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou (*vs controle; p<0,05).

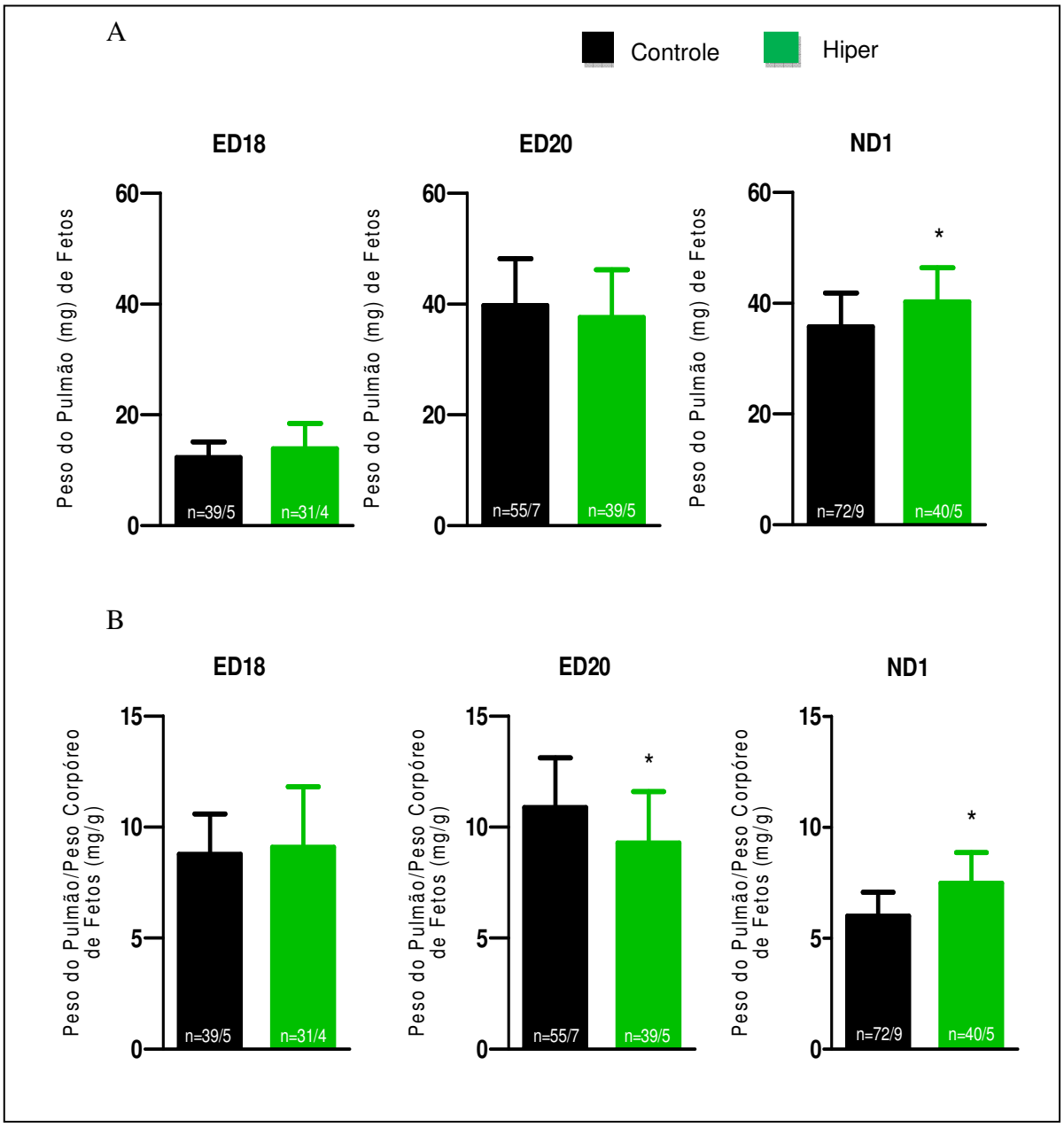

Figura 16: Média do peso úmido do pulmão esquerdo (A) e razão peso do pulmão esquerdo/peso corpóreo (B) dos fetos. O n refere-se ao número total de fetos avaliados por grupo, cujo divisor relaciona-se ao número de mães que os gerou (*vs controle; p<0,05).

5.4 Efeito do hipertiroidismo experimental sobre componentes do SRA cardíaco da prole

5.4.1 Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA

O coração é um dos principais órgãos-alvo da ação dos HTs cujos efeitos são em parte mediados pela modulação de alguns dos componentes do SRA. Neste sentido, a ECA é o componente mais importante na produção local de Angiotensina II no coração de roedores (Balcells et al., 1997). Desta forma, para melhor compreender a interação entre os HTs e o SRA cardíaco avaliou-se a atividade da ECA no coração das proles estudadas (Figura 17).

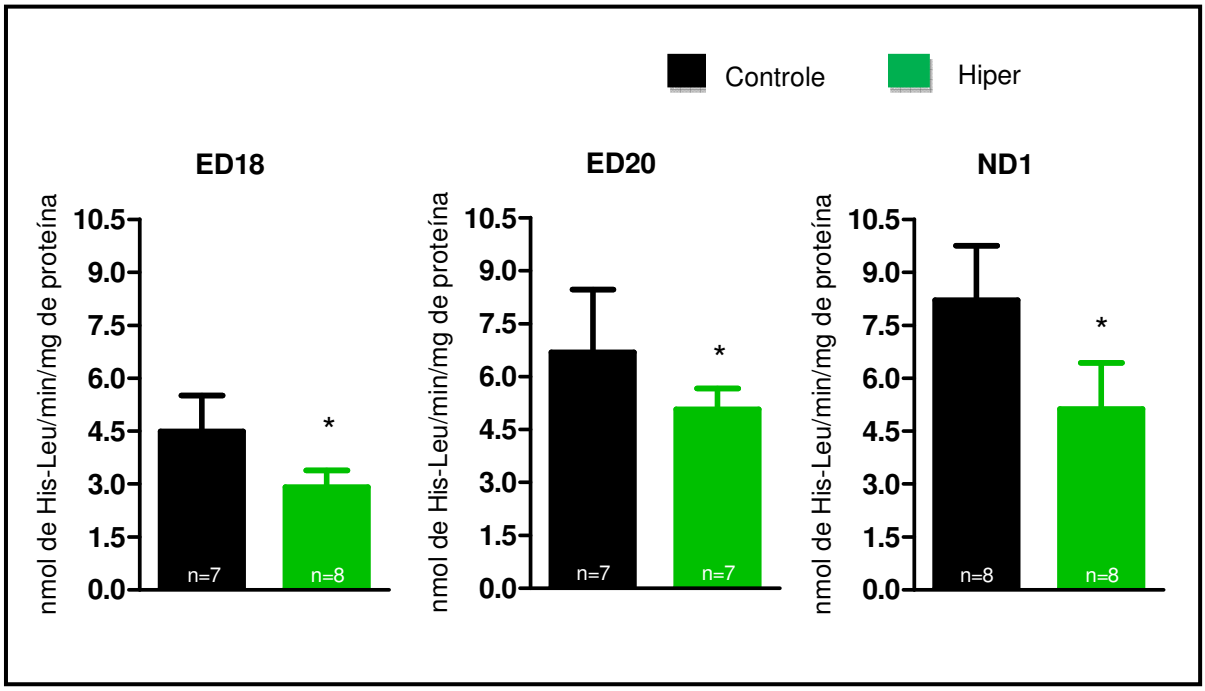

Figura 17: Atividade da ECA no tecido cardíaco de fetos provenientes de mães controle ou hipertiroideas. Valores da atividade da ECA são expressos em nmol de His-Leu/min/mg de proteína. O n representa o número de corações de fetos nos quais foi avaliada a atividade enzimática. (*vs controle; p<0,05).

Conforme pode ser observado, os dados obtidos mostram que a atividade da ECA encontra-se significativamente diminuída no tecido cardíaco das proles de ratas hipertiroideas, em qualquer dos períodos experimentais avaliados, apresentando uma redução de aproximadamente 64% em ED18, de 75% em ED20 e de 62% em ND1.

5.4.2 Expressão Protéica de componentes do SRA

Após análise da atividade da ECA no tecido cardíaco da prole dos diferentes grupos experimentais, passamos a avaliar a expressão protéica de alguns dos componentes do SRA (Figuras 18, 19 e 20), uma vez que, no tecido cardíaco de ratos adultos, já é descrita a modulação de tais componentes frente ao hipertiroidismo, conforme citado previamente.

A análise da expressão protéica de AngI/II nos corações das proles (Figura 18) mostra que o hipertiroidismo gestacional não promoveu alterações significativas na expressão destes peptídeos, nos diferentes períodos avaliados, embora haja uma clara tendência de diminuição na prole de mães hipertiroideas em ND1.

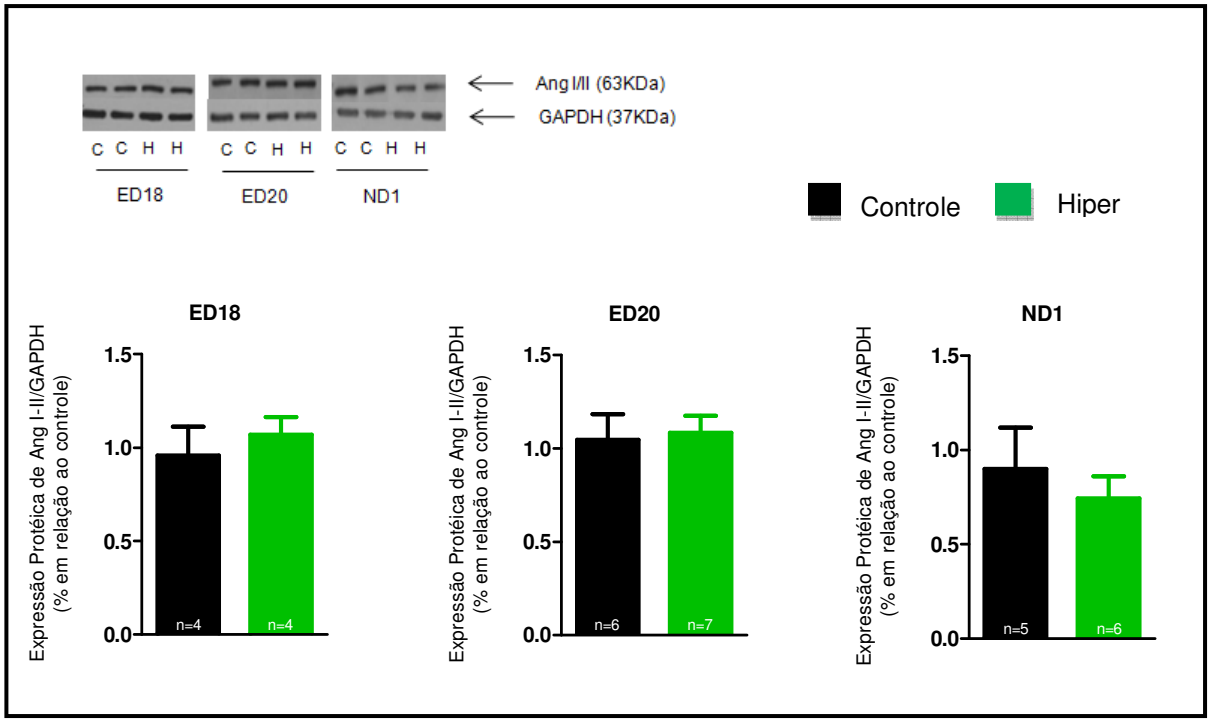

Figura 18: Análise da expressão protéica de Ang I/II no tecido cardíaco de fetos nos diferentes períodos avaliados. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n representa o número de corações de fetos nos quais foi avaliada a expressão protéica.

Ainda, a expressão dos receptores AT1 e AT2 (Figuras 19 e 20, respectivamente) também foi avaliada nos corações da prole submetida à situação de hipertiroidismo materno. Conforme pode ser observado a seguir, o hipertiroidismo promoveu um aumento significativo dos níveis de AT1 na prole em ED18, enquanto que em ND1 ocorreu uma diminuição nos níveis protéicos de tal receptor (Figura 19).

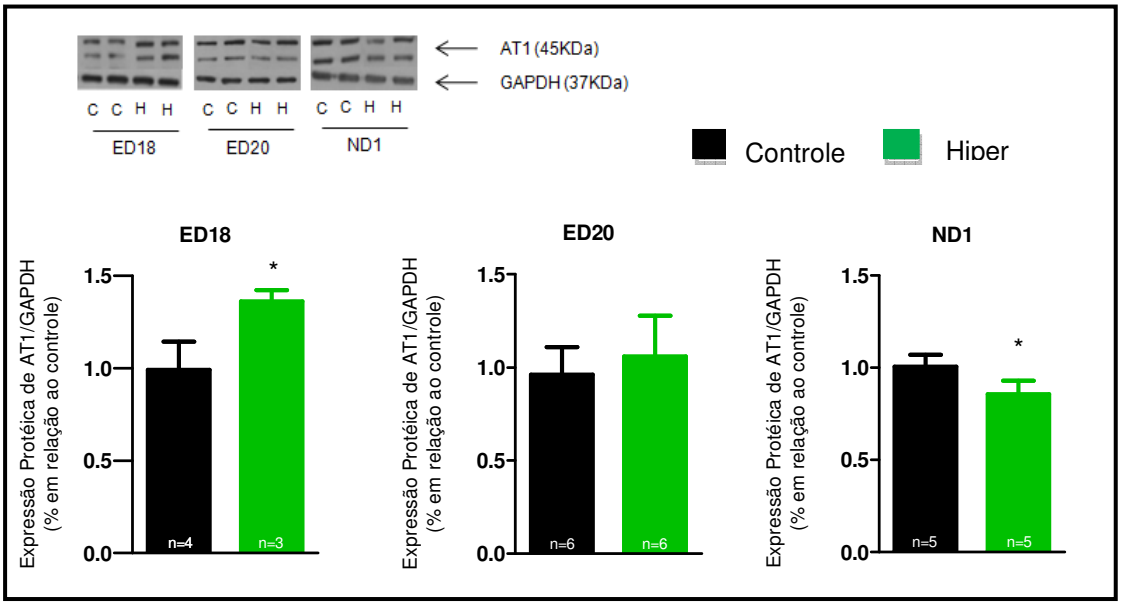

Figura 19: Análise da expressão protéica do receptor AT1 no tecido cardíaco de fetos. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n representa o número de corações de fetos nos quais foi avaliada a expressão protéica. (*vs controle; p<0,05).

Em relação à análise dos níveis de AT2, nossos dados mostram que houve um significativo aumento nos níveis protéicos deste receptor na prole de mães hipertiroideas em ED18.

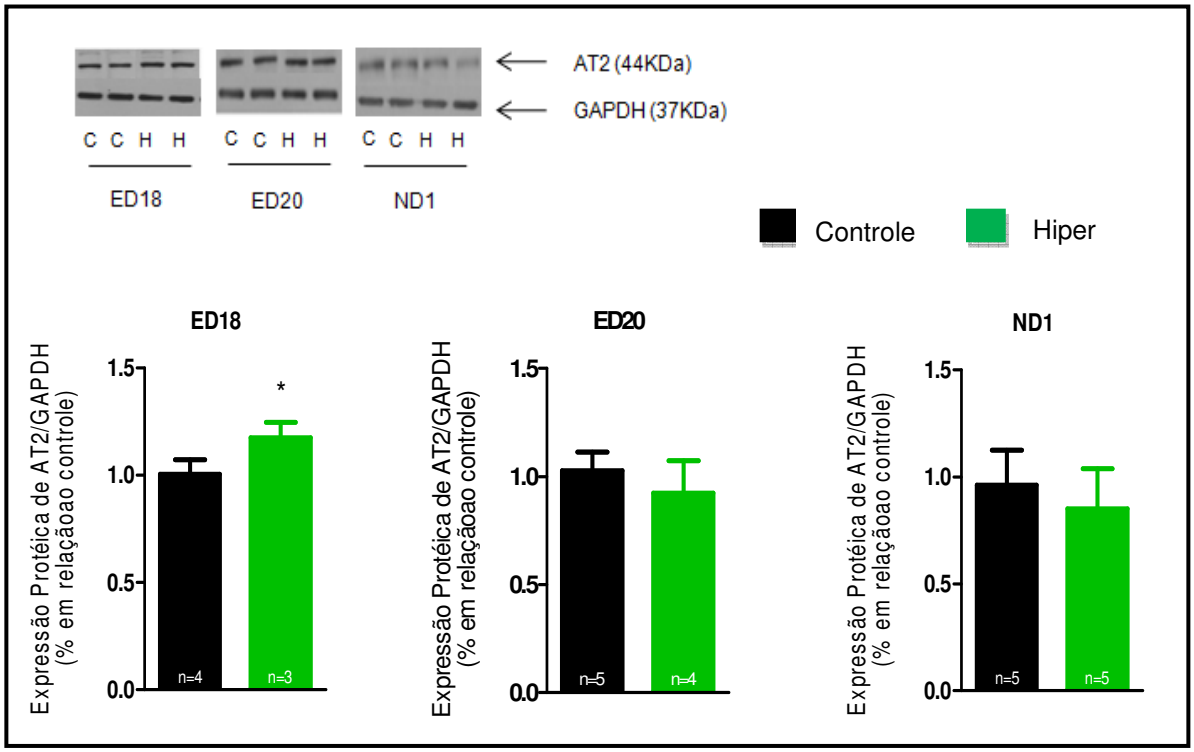

Figura 20: Análise da expressão protéica do receptor AT2 no tecido cardíaco de fetos. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. O n representa o número de corações de fetos nos quais foi avaliada a expressão protéica. (*vs controle; p<0,05).

6 DISCUSSÃO

Já é muito bem estabelecido que os hormônios tiroideanos possuem um papel fundamental no desenvolvimento, crescimento e metabolismo de vertebrados de maneira geral. Suas ações ocorrem desde o período embrionário e se estendem até períodos pós-natais, onde participam da maturação, crescimento, diferenciação e regulação da atividade metabólica de órgãos. Paralelamente, sabe-se que, em indivíduos adultos, o hipertiroidismo corresponde a uma das doenças endócrinas mais freqüentes e geralmente é acompanhado por uma série de alterações cardiovasculares que culminam com a hipertrofia cardíaca (Shirani et al., 1993). Neste sentido, evidências de estudos epidemiológicos têm demonstrado que inúmeras doenças que acomentem o indíviduo adulto podem ter sua origem já durante a vida intrauterina em virtude do ambiente perinatal desfavorável ao qual o embrião está exposto (Batistta et al., 2002). Isto porque o indivíduo mantém-se plástico ao longo do desenvolvimento de modo que o crescimento fetal torna-se um produto não apenas dos próprios genes, mas também da influência imposta pelo ambiente, caracterizando o que hoje é conhecido como programação fetal (Barker et al., 1999). A relação entre a hipótese da origem fetal e suas repercussões na vida adulta foi definitivamente estabelecida através de estudos em adultos que forneceram conexões diretas entre marcadores da vida fetal e doenças cardiovasculares na vida adulta (Whincup, 1999).

Além disso, está muito bem demonstrado e consolidado na literatura que os hormônios tiroideanos são capazes de interagir com o SRA. Estudos do nosso grupo confirmam esta importante interação endócrina, uma vez que a administração de inibidores do SRA foram capazes de prevenir a hipertrofia cardíaca induzida pelos hormônios tiroideanos (Hu et al., 2003). Soma-se a isso a descorberta de SRA locais e as inúmeras demonstrações da interação entre os HTs e o SRA locais, mais especificamente o SRA cardíaco. Assim, Kobori e colaboradores demonstraram que, em ratos, o aumento do nível plasmático de T4 promoveu o aumento da expressão do RNAm para renina no tecido cardíaco, de maneira independente do SRA sistêmico (Kobori et al., 1999). Desta forma, no presente estudo, nós avaliamos a possível contribuição do hipertiroidismo materno no desenvolvimento fetal, bem como as repercussões para o SRA cardíaco do feto.

6.1 Hipertiroidismo experimental: efeitos sobre as mães

A eficácia do nosso protocolo experimental foi confirmada através das dosagens séricas dos HTs e da análise da relação peso do coração (g)/comprimento da tíbia (mm). Em relação às dosagens séricas de HTs as ratas que receberam T4 na água de beber apresentaram um aumento de aproximadamente 12 e 5,5 vezes nos níveis de T4 e T3 total, respectivamente, em relação às ratas controle. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que também mostram aumento dos níveis séricos de HTs após administração de 12mg de T4 por litro de água em ratos adultos (Ladenson et al., 1986; Araújo et al., 2006, 2007, 2008). O aumento da razão peso do coração/comprimento da tíbia comprova a ação trófica dos hormônios tiroideanos sobre o tecido cardíaco como descrito em inúmeros trabalhos (Hu et al., 2005; Kahaly et al., 2005; Diniz et al., 2009; Carneiro-Ramos et al., 2010). Ainda em relação às dosagens hormonais, observa-se que há um aumento dos níveis séricos de T4 e T3 total nas ratas dos grupos controle em ND1, quando comparadas às ratas do mesmo grupo, porém em ED20. Tal evento já é bem estabelecido como sendo característico de gestações normais e é acompanhado pelo aumento dos níveis séricos de TBG (globulina transportadora de hormônio tiroideano) (Glinoer et al., 1990).

Sabe-se ainda que os hormônios tiroideanos são de fundamental importância na regulação do gasto energético e do índice metabólico basal, uma vez que tais hormônios afetam numerosos processo celulares relevantes para o gasto energético (Kim, 2008; Silva,1995). O aumento da taxa metabólica decorrente do estado de hipertiroidismo pode ser o principal responsável pelo aumento do consumo de água e ração dos animais nessas condições. Nossos resultados mostram um significativo aumento do consumo de água das mães hipertiroideas a partir de ED20 e um aumento em torno de 20% no consumo diário de ração em ND1. Ainda, uma possível modulação do sistema reprodutivo via HTs não foi observada, uma vez que o número médio de fetos/mães não diferiu entre os grupos controle e hipertiroideo. Esses dados corroboram com os dados descritos na literatura que mostram que não há alteração no número de fetos por ninhada das mães hipertiroideas, em relação às mães eutiroideas (Evans, 2002; Spencer et al., 1993).

6.2 Hipertiroidismo experimental: efeitos sobre a prole

A prole proveniente de mães hipertiroideas apresentou um aumento do peso corpóreo em ED18 e ED20. Neste sentido, Spencer (1993) descreve que, após a indução do hipertiroidismo materno através de injeções diárias de 10ug de T4, a prole em ED20 também apresentou aumento de peso corpóreo em relação ao grupo controle. Tais resultados são, provavelmente, devido à importância e ação dos hormônios tiroideanos ao longo do desenvolvimento, crescimento e maturação de órgão e tecidos (Schwartz, 1983). Além disso, inúmeros trabalhos demonstraram que os hormônios tiroideanos são responsáveis pela ativação de programas de diferenciação em múltiplos tecidos (Heron, 1996; Cooke, 1994; Shafrir, 1994). Desta forma, é possível que nos fetos cujas mães são hipertiroideas haja, em virtude das altas concentrações de hormônio tiroideano, um desenvolvimento mais acelerado em relação à prole controle. Paralelamente, dados de nosso laboratório mostram que numa situação de hipotiroidismo gestacional, o peso corpóreo da prole está significativamente diminuída em relação ao da prole de mães controles em ED20 e ND1 (dados não publicados). Em conjunto, esses dados ratificam a importância destes hormônios para o desenvolvimento e crescimento ótimo do embrião no ambiente intrauterino.

Com relação à prole proveniente de mães hipertiroideas em ND1, nossos dados divergem daqueles expostos na literatura, onde é descrito um aumento de peso corpóreo no 1° dia pós natal (Spencer, 1993). A ausência do aumento de peso pode ter sido influenciada pela ausência de aleitamento materno observado no grupo hipertiroideo. Essa condição deve-se à redução dos níveis de prolactina sérica que ocorre em ratas com hipertiroidismo gestacional, a qual já foi demonstrada previamente por Varas et al. (2002). Além disso, prejuízos no comportamento materno e na ejeção do leite nessas condições também já foram demonstrados (Rosato et al., 1992). Isto porque o excesso de hormônio tiroideano inibe a liberação de TRH pelo hipotálamo (feedback negativo) e este, por sua vez, parece estar envolvido com a liberação de prolactina durante a lactação.

Outro importante parâmetro que pode influenciar o desenvolvimento intrauterino dos fetos e, portanto, auxiliar na compreensão e estudo do peso corpóreo da prole é a placenta. Battista (2002) acredita que a redução do peso das placentas, juntamente com alterações no calibre arteriolar, sejam fatores importantes na redução da perfusão placentária, o que traria conseqüências ao peso e

comprimento dos fetos. Por outro lado, assim como observado no presente estudo, Langley-Evans et al. (1996) demonstraram a relação entre baixo peso ao nascimento e aumento do peso da placenta utilizando um modelo de restrição de proteína na dieta de ratas prenhas. Desta forma, fica evidente que o aumento do peso placentário, o que num primeiro momento poderia ser um indicativo de maior aporte nutricional para o feto, nem sempre é benéfico. Langley-Evans acreditam ainda que o baixo peso ao nascimento e o alto peso placentário são fortes indicativos de uma nutrição deficiente durante a gravidez. Além disso, Majumdar et al. (2005) afirmam que complicações gestacionais, tais como a hipertensão e diabetes, refletem significativamente na estrutura placentária, tanto macroscopicamente como microscopicamente. Neste sentido, já é descrito em ratos adultos que, em alguns modelos de indução ao hipertiroidismo experimental, ocorre concomitantemente o desenvolvimento da hipertensão arterial. Klein (1990) explica que o reforço das funções hemodinâmicas produzidas pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) é o principal fator para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano, que é seguida, em alguns casos, pela hipertensão arterial. Assim, embora os níveis pressóricos das ratas prenhas não tenham sido mensurados neste estudo, dados do nosso laboratório mostram que ratos adultos tornam-se hipertensos após a indução do hipertiroidismo. Dessa forma, acreditamos que, de fato, o hipertiroidismo gestacional tenha repercutido nos níveis pressóricos das ratas prenhas, possivelmente gerando a hipertensão e, consequentemente, alterações placentárias que culminaram com o baixo peso ao nascimento.

Paralelamente, sabe-se que a razão dada pelo peso da placenta/peso corpóreo (PP/PC) corresponde a uma relação crítica, visto que diferentes estudos a relacionam com risco de doença cardiovascular na vida adulta (Barker et al*.,* 1989, 1990; Leon et al*.,* 1998). Neste sentido, se por um lado estudos mostram que o elevado peso da placenta pode refletir um aumento da pressão arterial em crianças (Law et al*.,* 1991; Moore et al*.,* 1996), por outro, achados já mostraram uma relação inversa entre esses dois parâmetros (Willians et al*.,* 1992; Whincup et al*.,* 1995; Taylor et al*.,* 1997). Considerando que a eficiência placentária possa ser traduzida pela relação PP/PC, esta mostrou-se diminuída na prole de mães hipertiroideas em ED20. Então, sabendo-se que a placenta é fonte de muitos peptídeos e hormônios esteróides que influenciam o desenvolvimento e metabolismo fetal, placentário e

materno e, portanto, ocupa um papel chave na programação fetal, a diminuição dessa relação pode ser um indicativo da ineficiência placentária, o que talvez possa estar relacionado ao baixo peso ao nascimento observado no grupo hipertiroideo. Em suma, os dados de peso ao nascimento dos grupos de ratas hipo e hipertiroideas mostram que, sem dúvida, os hormônios tiroideanos são de fundamental importância para o desenvolvimento adequado do feto no ambiente intrauterino. Portanto, a ausência ou excesso destes hormônios atuam distintamente, provavelmente interferindo em vários mecanismos que controlam o crescimento e desenvolvimento. Assim, levando em consideração que o baixo peso ao nascimento, por sua vez, vem sendo relacionado, ao longo de 20 anos, a inúmeras doenças na vida adulta, tais como: doença isquêmica do coração, obesidade, hipertensão, e diabetes tipo II, um estudo da prole adulta em nosso modelo experimental seria imprescindível para obtenção de dados conclusivos a respeito dessas doenças e a possível relação com o hipertiroidismo gestacional.

Dados estabelecidos na literatura, inclusive aqueles obtidos pelo nosso grupo, demonstram claramente no adulto a influência dos hormônios tiroideanos sobre o trofismo cardíaco (Diniz et al*.,* 2007; Anjos-Ramos et al*.,* 2006; Kobori et al*.,* 1997, 1998). Porém, a ação de tais hormônios no período fetal e as possíveis repercussões do hipertiroidismo gestacional no desenvolvimento e crescimento do coração na prole ainda permanece desconhecida. Neste sentido, Bernardi (2006) esclarece que, em ratos, o perído de organogênese e desenvolvimento fetal está compreendido entre o 6° e 15° dias e entre o 16° e 21° dias de gestação, respectivamente. Dessa forma, os dados obtidos neste estudo (em ED20 e ND1) mostram que o aumento da razão peso coração/peso corpóreo, a qual é indicativa da hipertrofia do órgão, evidencia a ação trófica dos HTs sobre o coração também no período embrionário e fetal.

Com relação ao efeito dos hormônios tiroideano sobre outros tecidos como o rim, a hipertrofia renal é outra conseqüência do hipertiroidismo já muito bem descrita na literatura (Nakamura et al*.,* 1964; Bradley et al*.,* 1974; Garcia del Rio et al*.,* 1997; Carneiro-Ramos et al*.,* 2006). Dessa forma, sabe-se que distúrbios da tireóide são acompanhados por importantes mudanças hemodinâmicas (Klein et al*.,* 1995; Larsen et al*.,* 1998), sendo que, usualmente, as alterações patofisiológicas do hipertiroidismo são opostas àquelas presentes no hipotiroidismo. Assim, a análise do peso renal de fetos de mães hipertiroideas mostrou, em nosso estudo, estar

aumentada apenas em ED20. Entretanto, a razão entre o peso renal e o peso corpóreo dos fetos evidencia a ocorrência de hipertrofia renal em ED20 e ND1. Kobori (1998) acredita que a hipertrofia renal em decorrência ao hipertiroidismo, em ratos adultos, pode ser resultante de dois mecanismos distintos: ativação do SRA sistêmico ou local ou por alterações hemodinâmicas. Neste sentido, Iglesias (2009) afirma que, em humanos, as alterações hemodinâmicas, aumento no volume sistólico e da freqüência cardíaca combinados com a diminuição da resistência vascular periférica também participam das alterações da função renal no hipertiroidismo. Assim, a hipertrofia renal presente na prole de ratas hipertiroideas está de acordo com dados literários descritos em ratos adultos e em humanos.

Além dos rins, o desenvolvimento, maturação e função pulmonar são processos que também sofrem grande influência dos HTs, uma vez que há receptores para tais hormônios em mútiplos tipos celulares do pulmão (Oden et al., 2005) e que a expressão destes receptores aumenta no tecido pulmonar fetal durante a gestação (Massaro et al., 2002; Archavachotikul et al., 2002). Assim, o termo "maturação pulmonar" refere-se ao processo de produção de surfactante. O termo "desenvolvimento pulmonar" envolve os fenômenos de crescimento de estruturas pulmonares e suas diferenciações (Gaultier, 1988).

Sabe-se ainda que a tireoglobulina sérica, elevada em situações de hipertiroidismo, inibe a expressão do fator de transcrição 1 tireoideano (TTF1) (thyroid transcription factor-1) que é necessário para diferenciação normal do epitélio pulmonar e organização tecidual (Zimmerman, 1999; Zhou et al., 2001). Dessa forma, a tireotoxicose pode, secundariamente, regular negativamente TTF-1 e assim afetar a maturação e desenvolvimento do epitélio celular do pulmão (Oden et al., 2005). Neste sentido, a redução da razão peso do pulmão / peso corpóreo da prole em ED20 pode caracterizar o prejuízo no desenvolvimento e maturação pulmonar, em decorrência da situação de hipertiroidismo gestacional a que estes fetos foram submetidos.

Embora as ações dos HTs no desenvolvimento cardiovascular ainda permaneçam sem total compreensão, já é bem estabelecido que a função cardíaca relaciona-se intimamente com o estado tireoideo. Os efeitos hemodinâmicos dos HTs, acentuados em situações de hipertiroidismo, incluem o aumento da freqüência cardíaca, fração de ejeção e volume sanguíneo e a diminuição da resistência vascular sistêmica (Wassem et al., 2006). Neste sentido, Nakchbandi (1999) sugere

que a hipertensão pulmonar pode ser causada pela disfunção do ventrículo esquerdo, doenças valvulares ou do miocárdio, entre outras. Ainda, alguns estudos como de Martos Velasco (1992) citam inúmeras associações entre HTs e hipertensão pulmonar e outros relatam a correção deste quadro clínico após uso de fármacos anti-tireóide. Dessa forma, o aumento do peso do pulmão esquerdo na prole de ratas hipertiroideas em ND1, bem como de sua razão com o peso corpóreo, evidencia a ocorrência de hipertrofia pulmonar que pode estar relacionada ao desenvolvimento da hipertensão pulmonar. Assim, estudos demonstram que embora incomum, o hipertiroidismo no período neonatal tem sido associado com a hipertensão pulmonar entre adultos (Marvisi et al., 2002; Nakchbandi et al., 1999), confirmando, mais uma vez, a importância dos HTs no desenvolvimento fetal e pós-natal e, consequentemente, na vida adulta.

6.3 Efeitos sobre o SRA cardíaco

Inúmeros estudos, inclusive os de nosso grupo, têm demonstrado a participação do SRA no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, induzida pelo hipertiroidismo, em indivíduos adultos (Kobori et al., 1997, 1999; Basset et al., 2001; Hu et al., 2003; Carneiro-Ramos et al., 2010). Neste processo, o SRA local/cardíaco desempenha um papel fundamental. É sabido que os HTs podem afetar as concentrações teciduais de ECA através de inúmeros mecanismos, destacando-se a ação direta na expressão gênica ou na síntese protéica de ECA, bem como ações sobre outros componentes do SRA, que, por sua vez, podem influenciar a concentração tecidual final desta enzima. Assim, uma vez caracterizada a hipertrofia cardíaca na prole de mães hipertiroideas e, em busca da melhor compreensão deste fenômeno e da participação do SRA cardíaco, realizou-se a análise da atividade da ECA nos corações dos fetos. Os resultados mostram uma significativa diminuição da atividade enzimática no tecido cardíaco de fetos provenientes de ratas hipertiroideas, em todos os períodos avaliados. Tais resultados corroboram aqueles demonstrados por Carneiro-Ramos et al., (2006) em ratos adultos, onde ocorre redução da atividade da ECA no coração de ratos hipertiroideos sem que houvesse alteração da atividade da enzima no soro, o que comprova a modulação do SRA local independentemente do sistêmico. Assim, Carneiro-Ramos et al., (2006) sugeriram que as propriedades cardioprotetoras dos HTs pudessem ser

parcialmente atribuídas à diminuição da atividade local da ECA, o que poderia resultar na diminuição dos níveis de Ang II.

Em coração de humanos, cerca de 10 a 20% da formação de Ang II é devido à conversão de Ang I em Ang II pela ECA (Urata et al., 1990), mas a formação de Ang II independentemente da ECA já foi descrita ocorrer em corações de cachorros e hamsters (Gondo et al., 1989) através de uma enzima denominada quimase (Chy). Em roedores, a formação de Ang II no coração é atribuída principalmente à ECA, sendo que apenas 25% forma-se pela ativação das quimases (Balcells et al., 1997). Os dados deste estudo, referentes à expressão protéica de Ang II no tecido cardíaco dos fetos, nos diferentes períodos avaliados, mostram que não houve diferença significativa deste componente do SRA entre os grupos de proles provenientes de mães controles e hipertiroideas. Porém, nota-se que em ND1 os níveis protéicos de Ang I/II apresentam uma clara tendência à diminuição, enquanto que, na prole proveniente de mães hipotiroideas, os níveis de tal peptídeo não diferem daqueles encontrados na prole controle. Assim, tal tendência observada na prole de mães hipertiroideas pode ser conseqüência da menor atividade da ECA observada nos períodos que antecedem o nascimento (ED18 e ED20) e ainda ao nascimento (ND1). Entretanto, uma vez que o anticorpo utilizado é capaz de reconhecer Ang I e Ang II como uma única banda, não é possível distinguir se há alterações distintas nas quantidades desses peptídeos separadamente. Portanto, a quantificação dos níveis de Ang I e Ang II nos homogenatos de tecido cardíaco fetal, através da utilização de HPLC, é de fundamental importância para melhor compreensão de tais resultados. Neste sentido, algumas evidências sugerem que, no sistema cardiovascular, a Ang II possa agir como um fator de crescimento (Yamazaki et al., 1996), ou ainda aumentar a produção de proteínas comprometidas com a hipertrofia de células musculares lisas (Geisterfer et al., 1988) e miócitos cardíacos (Diniz et al., 2009), além de induzir a hiperplasia dos fibroblastos cardíacos de ratos (Sadoshima et al., 1993; Schorb et al., 1993).

As ações da angiotensina II são deflagradas após a sua ligação a dois receptores distintos, AT1 e AT2. Nossos dados mostram que a expressão protéica de AT1, no tecido cardíaco, está significativamente aumentada em ED18 e diminuída em ND1. Em relação ao receptor AT2, nosso estudo mostrou que a expressão protéica deste receptor está aumentada no coração de proles provenientes de mães hipertiroideas em ED18. Neste sentido, dados do nosso grupo

mostram que no coração de ratos hipertiroideos adultos a expressão protéica de AT1 não difere daquela encontrada no grupo controle. Com relação ao AT2, este encontra-se aumentado no tecido cardíaco de ratos hipertiroideos e que, o bloqueio farmacológico deste receptor previne a hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano (Carneiro-Ramos et al., 2010). Em conjunto, tais dados sugerem que os mecanismos que regulam a expressão dos receptores de Ang II no tecido cardíaco podem ser diferentes no adulto e no feto, haja vista que Ito et al. (2001) demonstraram a diminuição da expressão de renina renal apenas em indivíduos adultos e não nos fetos, após desenervação renal. Além disso, a possível ação trófica da Ang II sobre o tecido cardíaco, descrita em alguns estudos (Cohn et al., 2000; Rosenkranz, 2004), pode ocorrer por uma ação intrácrina de tal peptídeo (Baker et al., 2004), visto que, além de acoplados à membrana plasmática, os receptores de Ang II foram detectados no sarcolema, túbulos T e núcleo de cardiomiócitos (Fu et al., 1998). Dessa forma a ausência de modulação dos níveis protéicos de AT1 e AT2 no coração de fetos hipertiroideos não exclui, de maneira irrefutável, a participação de tais receptores no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca presente nesta prole em ED20.

Em ED18, o aumento dos níveis de AT1 e AT2 corroboram com dados da literatura que demonstram a participação de tais receptores no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano no indivíduo adulto. Embora tais receptores tenham sido descritos classicamente como possuírem respostas antagônicas, alguns estudos têm demonstrado que em tecidos que expressam ambos receptores, como o coração, AT1 e AT2 compartilham vias de sinalização. Desta maneira a reposta clássica e antagônica descrita para AT1 e AT2 nem sempre é observada, podendo ocorrer efeitos similares após a estimulação destes receptores. A diminuição significativa de AT1 na prole em ND1 e provenientes de mães hipertiroideas pode ser um mecanismo compensatório, numa tentativa de conter o avanço da hipertrofia cardíaca, já instalada desde ED18. Neste sentido, Diniz (2009) demonstrou que o bloqueio do receptor do tipo I de Angiotensina, em cultura de cardiomiócitos de neonatos, previne o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano Ainda neste período, sugerimos que a tendência de diminuição de Ang I/II pode estar relacionada à diminuição dos níveis de atividade da ECA (desde ED18) também possa ser reflexo de mecanismos anti-

hipertróficos, uma vez que, como dito anteriormente, está é a principal enzima conversora de Angiotensina em coração de roedores.

Diante do exposto o presente estudo reforçou mais uma vez a importância dos HTs para o desenvolvimento, crescimento, maturação e diferenciação de tecidos e órgãos de excelência, tais como coração, pulmões e rins. Além disso, mostramos que a interação entre HTs e SRA no processo de hipertrofia cardíaca, tão bem descrita e consolidada na literatura em indivíduos adultos, também se faz presente no período fetal e neonatal, apresentando diferentes modulações de acordo com cada período avaliado.

7 Conclusões

O presente estudo permite-nos, até este momento, concluir que:

- o hipertiroidismo gestacional é capaz de promover aumento do peso corpóreo dos fetos em ED18, ED20 e ND1, com diminuição da razão peso da placenta/peso corpóreo apenas em ED20;

- a prole de mães submetidas ao hipertiroidismo gestacional apresenta hipertrofia cardíaca, renal e pulmonar em ED20 e ND1;

- o hipertiroidismo gestacional é capaz de promover a diminuição da atividade da ECA no tecido cardíaco de fetos em todos os períodos avaliados;

- embora haja diminuição da atividade da ECA no coração de fetos provenientes de ratas hipertiroideas em todos os períodos avaliados as expressões protéicas de Ang II não são moduladas neste mesmo tecido.

- os níveis protéicos de AT1 e AT2 estão significativamente aumentados em ED18, enquanto que o AT1 está diminuído em ND1.

Referências*

Ahmed A, Li XF,Gregory J, et al. Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. J Clin Invest. 1995;96:848-57.

Andrade VA, Gross JL, Maia AL. Tratamento do Hipertireoidismo da Doença de Graves. Arq Bras Endocrinol Metab. 2001 Dez;45(6):609-18.

Anjos-Ramos L, Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, et al. Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. Virchows Arch. 2006;448(4):472-9.

Araujo AS, Enzveiler AT, Schenkel P, Fernandes TR, Ribeiro MF, Partata WA, Llesuy S, Belló-Klein A. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. Mol Cell Biochem. 2007 Sep;303(1-2):89-95.

Araujo AS, Ribeiro MF, Enzveiler A, Schenkel P, Fernandes TR, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S, Belló-Klein A. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. Mol Cell Endocrinol. 2006 Apr;249(1-2):133-9.

Araujo ASR, Schenkel P, Enzveiler AT, Fernandes TR, Partata WA, Llesuy, S, Ribeiro, MFM, Khaper N, Singal PK and Belló-Klein A. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. Journal of Molecular Endocrinology. 2008;41:423-30.

Archavachotikul K, Ciccone TJ, Chinoy MR, Nielsen HC, Volpe MV. Thyroid hormone affects embryonic mouse lung branching morphogenesis and cellular differentiation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Mar;282(3):L359-69.

Balcells E, Meng QC, Johnson WH Jr, Oparil S, Dell'Italia LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. Am J Physiol. 1997 Oct;273(4 Pt 2):H1769-74.

Ballard PL. Hormones and lung maturation. Monogr Endocrinol. 1986;28:1-354.

*De acordo com: International. Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22]....

Banday AA, Siddiqui AH,Menezes MM, et al. Insulin treatment enhances AT1 receptor function in OK cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2005;288(6):F1213-9.

Barker DJ. Fetal programming and public health. In: O´brien Shaughn PM, Wheeler T and Barker DJP. Fetal Programming – Influences on Development and Disease in Later Life. Londres: RCOG Press; 1999. p.3-11.

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ. 1989 Mar 4;298(6673):564-7.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ. 1990 Aug 4;301(6746):259-62.

Barreto-Chaves ML, Aneas I,Krieger JE. Glucocorticoid regulation of angiotensin-converting enzyme in primary culture of adult cardiac fibroblasts. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001;280(1): R25-32.

Basset A, Blanc J, Messas E, Hagège A, Elghozi JL. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. J Cardiovasc Pharmacol. 2001 Feb;37(2):163-72.

Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Jul;283(1):E124-31.

Bernardi MM. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: Spinosa HS, Górnik SL, Bernardi MM. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocr Rev. 2002 Feb; 23(1):38-89.

Bradley SE, Stephan F, Coelho JB, Reville P. The thyroid and the kidney. Kidney International.1974;6:346–65.

Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Almeida J, et al. Cardiac angiotensin II type I and type II receptors are increased in rats submitted to experimental hypothyroidism. J Physiol. 2007;583(1):213-23.

Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Nadu AP, Almeida J, Vieira RL, Santos RA, Barreto-Chaves ML. Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. Basic Res Cardiol. 2010 May;105(3):325-35.

Carneiro-Ramos MS, Silva V B, Santos RAS, et al. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. Peptides. 2006 Nov;27(11):2942-9.

Chan, SY, Vasilopoulou E,Kilby MD The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2009;5(1):45-54.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000 Mar;35(3):569-82.

Cooke PS, Zhao Y-D, Bunick D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. Biol Reprod. 1994;51:1000–5.

Corvol P, Schutz S, Gasc JM, et al. Early expression of all components of the renin-angiotensin system in human development. Adv Nephrol Necker Hosp. 1998; 28:195-212.

Cox BE, Ipson MA, Shaul PW, et al. Myometrial angiotensin II receptor subtypes change during ovine pregnancy. J Clin Invest. 1993;92(5):2240-8.

De Gasparo M, Whitebread S, Kalenga MK, et al. Down regulation of the angiotensin II receptor subtype AT2 in human myometrium during pregnancy. Regul Pept. 1994;53(1):39-45.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. Pflugers Arch. 2007;454(1):75-81.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. Basic Res Cardiol. 2009 Nov;104(6):653-67.

Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. Circulation. 1988;77(6 Pt 2):I4-13.

Efstratiadis A. Genetics of mouse growth. Int J Dev Biol. 1998;42(7):955-76.

Evans IM, Pickard MR, Sinha AK, Leonard AJ, Sampson DC, Ekins RP. Influence of maternal hyperthyroidism in the rat on the expression of neuronal and astrocytic cytoskeletal proteins in fetal brain. J Endocrinol. 2002 Dec;175(3):597-604.

Fisher, D. A. & A. H. Klein Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. N Engl J Med. 1981 304(12): 702-12.

Fowden AL. Endocrine regulation of fetal growth. Reprod Fertil Dev. 1995;7(3):351-63.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. Early Hum Dev. 2005 Sep;81(9):723-34.

Fowden AL, Hill DJ. Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. Br Med Bull. 2001;60:123-42.

Fu ML, Schulze W, Wallukat G, Elies R, Eftekhari P, Hjalmarson A, Hoebeke J. Immunohistochemical localization of angiotensin II receptors (AT1) in the heart with anti-peptide antibodies showing a positive chronotropic effect. Receptors Channels. 1998;6(2):99-111.]

Fyhrquist F e Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. J Intern Med. 2008; 264(3):224-36.

Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St Germain EA, Bates JM, St Germain DL. Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. J Clin Invest. 1999 Apr;103(7):979-87.

Garcia del Rio C, Moreno MR, Osuna A, de Dios Luna J, Garcia-Estan J, Vargas F. Role of the renin–angiotensin system in the development of thyroxine-induced hypertension. European Journal of Endocrinology 1997;136:656–60.

Gaultier C. Physiology and physiopathology in the development and maturation of the antenatal lung. Rev Mal Respir. 1988;5(3):213-22.

Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. Circ Res. 1988 Apr;62(4):749-56.

Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. Endocr Rev. 2008 Dec;29(7):898-938.

Glinoer D, de Nayer P, Bourdoux P, Lemone M, Robyn C, van Steirteghem A, Kinthaert J, Lejeune B. J. Regulation of maternal thyroid during pregnancy. Clin Endocrinol Metab. 1990 Aug;71(2):276-87.

Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Circulation. 1993; 87(6):1816-28.

Gondo M, Maruta H, Arakawa K. Direct formation of angiotensin II without renin or converting enzyme in the ischemic dog heart. Jpn Heart J. 1989 Mar;30(2):219-29.

Hackenthal E, Paul M, *et al.* Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. Physiol Rev. 1990;70(4):1067-116.

Harris JM e Gomez RA. Renin-angiotensin system genes in kidney development. Microsc Res Tech. 1997;39(3):211-21.

Heron MI, Rakusan K. Short- and long-term effects of neonatal hypo- and hyperthyroidism on coronary arterioles in rat. Am J Physiol. 1996 Nov;271(5 Pt 2):H1746-54.

Hu LW, Benvenuti LA*, et al.* Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003;285(6):R1473-80.

Hu LW, Liberti EA*, et al.* Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. Virchows Arch. 2005;446(3):265-9.

Iglesias P, Díez JJ. Thyroid dysfunction and kidney disease. Eur J Endocrinol. 2009 Apr;160(4):503-15.

Irani RA e Xia Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. Placenta. 2009; 29(9):763-71.

Ito H, Wang J, Strandhoy JW, Rose JC. Importance of the renal nerves for basal and stimulated renin mRNA levels in fetal and adult ovine kidneys. J Soc Gynecol Investig. 2001 Nov-Dec;8(6):327-33.

Kahaly GJ e Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. Endocr Rev. 2005; 26(5):704-28.

Kim B. Thyroid Hormone as a Determinant of Energy Expenditure and the Basal Metabolic Rate. Thyroid. Feb 2008; 18(2):141-44.

Klein I 1990 Thyroid hormone and the cardiovascular system.American Journal of Medicine 88 631–637.

Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Local renin-angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. J Endocrinol. 1999 Jan;160(1):43-7.

Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy in rats. J Endocrinol. 1998 Oct;159(1):9-14.

Kobori H, Ichihara A*,* Suzuki H*.* Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. Am J Physiol. 1997;273(2 Pt 2):H593-9.

Koopdonk-Kool JM, de Vijlder JJ, Veenboer GJ, Ris-Stalpers C, Kok JH, Vulsma T, Boer K, Visser TJ. Type II and type III deiodinase activity in human placenta as a function of gestational age. J Clin Endocrinol Metab. 1996 Jun;81(6):2154-8.

Ladenson PW, Kieffer JD, Farwell AP, Ridgway EC. Modulation of myocardial L-triiodothyronine receptors in normal, hypothyroid, and hyperthyroid rats. Metabolism. 1986 Jan;35(1):5-12.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. Placenta. 1996 Mar-Apr;17(2-3):169-72.

Law CM, Barker DJ, Bull AR, Osmond C. Maternal and fetal influences on blood pressure. Arch Dis Child. 1991 Nov;66(11):1291-5.

Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, et al.Reduce fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15000 Swedish men and women born 1915-1929. BMJ. 1998; 317:241-5,

Majumdar S, Dasgupta H, Bhattacharya A. A study of placenta in normal and hypertensive pregnancies. J. Anat. Soc. 2005; 54 (2):1-9.

Mancina R, Susini T*,* Renzetti *A,* et al*.* Sex steroid modulation of AT2 receptors in human myometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(5):1753-7.

Martos Velasco J. Primary pulmonary hypertension associated with hyperthyroidism. Aten Primaria. 1992 Mar;9(3):163-4.

Marvisi M, Brianti M, Marani G, Del Borello R, Bortesi ML, Guariglia A. Hyperthyroidism and pulmonary hypertension. Respir Med. 2002 Apr; 96(4):215-20.

Massaro D, Massaro GD. Invited Review: pulmonary alveoli: formation, the "call for oxygen," and other regulators. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002 Mar; 282(3):L345-58.

Matsumoto T, Sagawa N*,* Mukoyama M, et al. Type 2 angiotensin II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81(12):4366-72.

Moore VM, Miller AG, Boulton TJ, Cockington RA, Craig IH, Magarey AM, Robinson JS. Placental weight, birth measurements, and blood pressure at age 8 years. Arch Dis Child. 1996 Jun;74(6):538-41.

Morreale De Escobar G, Obregon MJ, Del Rey FE. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(11):3975-87.

Morreale de Escobar G, Obregón MJ, Calvo R, Escobar del Rey F. Effects of iodine deficiency on thyroid hormone metabolism and the brain in fetal rats: the role of the maternal transfer of thyroxin. Am J Clin Nutr. 1993 Feb;57(2 Suppl):280S-285S.

Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. Endocrinology. 1985 Nov;117(5):1890-900.

Naftilan AJ, Gilliland GK, Eldridge CS, et al. Induction of the proto-oncogene c-jun by angiotensin II. Mol Cell Biol. 1990;10(10):5536-40.

Nakamura RM, Miyada DS, Cockett AT, Moyer DL. Thyroid and pituitary gland activity during compensatory renal hypertrophy. Experientia 1964;20:694–6.

Nakchbandi IA, Wirth JA, Inzucchi SE. Pulmonary hypertension caused by Graves' thyrotoxicosis: normal pulmonary hemodynamics restored by (131)I treatment. Chest. 1999 Nov;116(5):1483-5.

Nielsen AH, Schauser KH, *et al.* Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. Placenta. 2000;21(5-6):468-77.

Nunes MT. Homônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2003;47(6):639-43.

Obregon MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. Endocrinology. 1978 Dec;103(6):2145-53.

Oden J, Cheifetz IM. Neonatal thyrotoxicosis and persistent pulmonary hypertension necessitating extracorporeal life support. Pediatrics. 2005 Jan;115(1):e105-8.

Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. Front Neuroendocrinol. 1998;19(3):232-52.

Radetti G, Zavallone A, Gentilli L, et al. Foetal and neonatal thyroid disorders. Minerva Pediatr. 2002;54(5):383-400.

Raizada MK, Rydzewski B, Lu D, et al. Angiotensin II type 1 receptor-mediated stimulation of c-fos gene expression in astroglial cultures. Am J Physiol. 1993;265(4 Pt 1):C1046-9.

Robillard JE, Schutte BC, Page WV, et al. Ontogenic changes and regulation of renal angiotensin II type 1 receptor gene expression during fetal and newborn life. Pediatr Res. 1994;36(6):755-62.

Rodien P, Coutant R, Vasseur C, et al. Thyroid dysfunction and pregnancy. Rev Prat. 2005;55(2):174-9.

Rosato RR, Gimenez MS, Jahn GA. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. Acta Endocrinol (Copenh). 1992 Dec;127(6):547-54.

Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. Cardiovasc Res. 2004 Aug 15;63(3):423-32.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. Circ Res. 1993 Sep;73(3):413-23.

Saridogan E, Djahanbakhch O, Puddefoot JR, et al. Type 1 angiotensin II receptors in human endometrium. Mol Hum Reprod 1996;2(9):659-64.

Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. Circ Res. 1993 Jun;72(6):1245-54.

Schwartz HL. Effect of thyroid hormone on growth and development. In: Oppenheimer JH, Samuels HH. Molecular basis of thyroid hormone action. New York: Academis Press; Ano. p. 413-44.

Shafrir E, Barash V, Zederman R, Kissilevitz R, Diamant YZ. Modulation of fetal and placental metabolic pathways in response to maternal thyroid and glucocorticoid hormone excess. Isr J Med Sci. 1994 Jan;30(1):32-41.

Shirani J, Barron MM, Pierre-Louis ML, Roberts WC. Congestive heart failure, dilated cardiac ventricles, and sudden death in hyperthyroidism.). Am J Cardiol. 1993 Aug 1;72(3):365-8.

Silva JE. Thyroid Hormone Control of Thermogenesis and Energy Balance. Thyroid. 1995;5(6):481-92

Spencer GSG e Robinson GM. Stimulation of placental, fetal and neonatal growth by thyroxine administration to pregnat rats. J Endocrinol. 1993 Nov;139(2):275-9.

Steele RE e Wekstein DR. Influence of thyroid hormone on homeothermic development of the rat. Am J Physiol. 1972;222(6):1528-33.

Taylor SJ, Whincup PH, Cook DG, Papacosta O, Walker M. Size at birth and blood pressure: cross sectional study in 8-11 year old children. BMJ. 1997 Feb 15;314(7079):475-80.

Tufro-Mcreddie A e Gomez RA. Ontogeny of the renin-angiotensin system. Semin Nephrol. 1993;13(6):519-30.

Urata H, Healy B, Stewart RW, Bumpus FM, Husain A. Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. Circ Res. 1990 Apr;66(4):883-90.

Varas SM, Muñoz EM, Hapon MB, Aguilera Merlo CI, Giménez MS, Jahn GA. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. Reproduction. 2002 Nov;124(5):691-702.

Wasseem R, Mazen E, Walid SR. Hyperthyroidism: a rare cause of reversible pulmonary hypertension. Am J Med Sci. 2006 Sep;332(3):140-1.

Whincup PH. Fetal origins of cardiovascular risk:evidence from studies in children. In: O´brien Shaughn PM, Wheeler T and Barker DJP. Fetal Programming Influences on Development and Disease in Later Life. Londres: RCOG Press; 1999.

Whincup P, Cook D, Papacosta O, Walker M. Birth weight and blood pressure: cross sectional and longitudinal relations in childhood. BMJ. 1995 Sep 23;311(7008):773-6.
Wilkes BM, Krim E, Mento PF. Evidence for a functional renin-angiotensin system in full-term fetoplacental unit. Am J Physiol. 1985;249(4 Pt 1):E366-73.

Williams S, St George IM, Silva PA. Intrauterine growth retardation and blood pressure at age seven and eighteen. J Clin Epidemiol. 1992 Nov;45(11):1257-63.

Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y. Molecular aspects of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. Mol Cell Biochem. 1996 Oct-Nov;163-164:197-201.

Zemel S, Millan MA, Aguilera G. Distribution of angiotensin II receptors and renin in the mouse fetus. Endocrinology. 1989;124(4):1774-80.

Zhou H, Morotti RA, Profitt SA, Langston C, Wert SE, Whitsett JA, Greco MA. Expression of thyroid transcription factor-1, surfactant proteins, type I cell-associated antigen, and Clara cell secretory protein in pulmonary hypoplasia. Pediatr Dev Pathol. 2001 Jul-Aug;4(4):364-71.

Zimmerman D. Fetal and neonatal hyperthyroidism. Thyroid. 1999 Jul;9(7):727-33.