

Juneo Freitas Silva

Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo

Defesa de tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientadora: Profa. Dra. Natália M. Ocarino

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014

S586e Silva, Juneo Freitas, 1985-
Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongo / Juneo Freitas Silva. – 2014.
162 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides

Co-orientadora: Natália M. Ocarino

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 3. Hipotireoidismo – Teses. 4. Trofoblasto – Teses. 5. Placenta – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Ocarino, Natália de Melo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 616.44

Tese defendida e aprovada em 09 de dezembro de 2014 pela Comissão Examinadora constituída por:

Natália de Melo Ocarino

Prof.^a. Natália de Melo Ocarino
Presidente

Ernane

Prof. Ernane Fagundes do Nascimento

Fernanda Almeida

Prof.^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

José Carlos Nogueira

Prof. José Carlos Nogueira

Raphael

Prof. Raphael Escorsim Szawka

Aos meus queridos pais Edith e Cardoso, por todo o carinho,
amor, apoio e exemplo.

“O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculos.”

Lao-Tsé

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida, que sempre estão presentes em todas as realizações da minha vida me dando força e amparo.

Aos meus queridos pais Maria Edith e Sebastião Cardoso, que sempre estiveram ao meu lado me possibilitando a realização deste trabalho. Obrigado pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e por abrirem mão de muitas coisas em prol de mim.

Aos meus irmãos Girlene e Gilson, que sempre estavam dispostos a me ajudar.

Ao meu sobrinho Yan Gabriel, pelo carinho e afeto constante.

Aos meus queridos avós, Eva e Agenor, que sempre acreditaram em mim e deram força, mesmo que distantes. Obrigado pelas orações.

À minha tia, madrinha e amiga Janinha (*in memoriam*), que sempre me apoiou em tudo que eu fiz. Obrigado pela ajuda constante, horas de descontração e por ter feito parte deste meu sonho. A saudade é grande.

À Profa. Rogéria Serakides, obrigado por ter acreditado e investido em mim, pela orientação e pelo apoio em todo o meu período como aluno de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. Exemplo profissional de seriedade, caráter, perseverança e dedicação que vou levar para o resto da minha vida. Serei eternamente grato.

À Profa. Natália de Melo Ocarino, que sempre me acompanhou e orientou durante a minha formação acadêmica e profissional. Obrigado pelos ensinamentos e exemplo de profissional.

À Jankerle, Amanda, Lorena e Cintia, que sempre estiveram ao meu lado me ajudando no que era preciso. Obrigado pelas horas e horas de conversa, risadas, ensinamentos. Obrigado por terem deixado todos esses anos de trabalho árduo tão mais leve e prazeroso.

Aos amigos, colegas e ex-colegas da Patologia, particularmente Silvia, Michele, Cláudia, Mariana, Sato, Carlos, Juliana, Fabiana, Talita, Amanda, Tatiane, Fiuza, Matheus, Camila, Erica, Teane, Ju Saes, Ingrid, Ana Patricia, Luciana e Auricélio, obrigado pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao residentes e ex-residentes do Setor de Patologia, Bruno, Dyeime, Maria, Laís, Vitor, Ana e Juliana, obrigado por toda a ajuda, amizade e pelo ótimo convívio.

Aos alunos e ex-alunos do DCCV, particularmente Karen, Isabel, Endrigo, Pablo, Heloísa e Telma, obrigado pela amizade.

Aos professores e ex-professores do Setor de Patologia, Renato de Lima Santos, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Ernane Fagundes do Nascimento, Roselene Ecco, Rogéria Serakides e Natália de Melo Ocarino, muito obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo profissional que sou hoje.

A Profa. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua da USP, por ter disponibilizado o seu laboratório para o meu treinamento, pela hospitalidade e pelos ensinamentos. Muito obrigado!

Ao Prof. Michael Soares da Universidade de Kansas pelo apoio.

Às técnicas do Laboratório de Patologia, Leimar e Natalia, obrigado por toda a ajuda na realização deste trabalho, pelas horas de conversa e aprendizado e pelas boas risadas que demos juntos.

Às secretarias Eliane, Flávia e Luzete, pela ajuda e convivência.

Às funcionárias da limpeza (em especial a Beth) e aos porteiros, obrigado pela convivência agradável e cooperação.

Às alunas de Iniciação Científica, Camila e Luciana, obrigado pela ajuda constante e amizade.

Aos professores José Monteiro da Silva e Guilherme Ribeiro Valle, obrigado pelas sugestões e pela ajuda para a finalização deste trabalho.

Aos componentes titulares Raphael Escorsim Szawka, Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, José Carlos Nogueira e Ernane Fagundes do Nascimento e aos suplentes Alan Maia Borges e Guilherme Ribeiro Valle, pela prontidão em compor a banca para avaliação desta tese.

Aos animais, à ciência e à pesquisa, que são os alicerces da minha vida profissional e o estímulo para sempre querer dar o melhor de mim e contribuir para o bem da sociedade.

Ao CNPq, FAPEMIG e PRPq, obrigado pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos que contribuíram para minha formação como pessoa e profissional. Serei eternamente grato.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	23
RESUMO	25
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	31
CAPITULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	33
1. Reprodução da rata.....	33
2. Placentação.....	34
2.1 Diferenciação trofoblástica.....	37
3. Invasão trofoblástica e células <i>natural killer</i> uterinas (uNKs).....	40
4. Endocrinologia placentária.....	41
4.1. <i>Estrógeno, progesterona e leptina placentária</i>	41
4.2. <i>Hormônios relacionados à prolactina (PRL)</i>	42
5. Imunologia placentária.....	43
5.1. <i>Receptores toll-like</i>	44
5.2. <i>Expressão de receptores toll-like e citocinas pró- e anti-inflamatórias na placenta</i>	45
5.3. <i>Fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na placenta</i>	45
6. Angiogênese placentária.....	46
6.1. <i>Fatores angiogênicos placentários</i>	48
7. Efeito dos hormônios tireoidianos na gestação.....	49
CAPITULO 2: A disfunção tireoidiana materna em ratas afeta o perfil imune placentário dos receptores <i>Toll-like</i> 2 e 4 e de citocinas pro e anti-inflamatórias	55
Resumo	55
Abstract	55
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	60
<i>Indução das disfunções tireoidianas</i>	60
<i>Expressão imunoistoquímica de INFγ, MIF e iNOS</i>	61

<i>Expressão gênica dos receptores Toll-Like 2 e 4.....</i>	69
<i>Expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias INFγ, MIF e TNFα.....</i>	69
<i>Expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e iNOS.....</i>	70
DISCUSSÃO.....	73
CAPÍTULO 3: Os fatores angiogênicos e hormonais placentários são afetados pelas disfunções tireoidianas maternas em ratas.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
INTRODUÇÃO.....	76
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
RESULTADOS.....	80
<i>Indução das disfunções tireoidianas.....</i>	80
<i>Expressão imunoistoquímica de VEGF e Flk-1.....</i>	81
<i>Expressão gênica dos fatores pró-angiogênicos VEGF, Flk-1 e PGF.....</i>	81
<i>Expressão gênica do fator anti-angiogênico sFlt-1.....</i>	88
<i>Expressão gênica dos hormônios PL-1 e rPlf.....</i>	88
DISCUSSÃO.....	89
CAPITULO 4: A cinética de migração trofoblástica intrauterina é afetada pelas disfunções tireoidianas maternas em ratas.....	92
Resumo	92
Abstract	92
INTRODUÇÃO.....	93
MATERIAL E MÉTODOS.....	94
RESULTADOS.....	97
<i>Indução das disfunções tireoidianas.....</i>	97
<i>Cinética da migração trofoblástica intrauterina.....</i>	97
<i>Expressão gênica das metaloproteinases de matriz 2 e 9.....</i>	101
<i>Expressão gênica de leptina placentária.....</i>	101
DISCUSSÃO.....	102
CAPÍTULO 5: Efeitos <i>in vitro</i> da triiodotironina na expressão de transcritos gênicos em células trofoblásticas de camundongo.....	105
Resumo	105
Abstract	105

INTRODUÇÃO.....	106
MATERIAL E MÉTODOS.....	106
RESULTADOS.....	108
<i>Diferenciação trofoblástica.....</i>	108
<i>Expressão gênica dos fatores pró-angiogênicos VEGF e PGF.....</i>	108
<i>Expressão gênica do mediador inflamatório INFγ.....</i>	109
<i>Expressão gênica do hormônio PL-1.....</i>	109
DISCUSSÃO.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXO 1: CERTIFICADO DO CETEA.....	129
ANEXO 2: TABELAS COM OS VALORES (MEDIA E DESVIO PADRÃO).....	131
ANEXO 3: PROTOCOLO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA IMUNOISTOQUÍMICA PELO PROGRAMA WCIF ImageJ	143
ANEXO 4: PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA.....	147
ANEXO 5: EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL COM TRIZOL (TECIDO).....	149
ANEXO 6: SÍNTESE DO cDNA.....	151
ANEXO 7: RT-PCR TEMPO REAL.....	153
ANEXO 8: REAÇÃO RT-PCR TEMPO REAL (CÉLULA).....	155
ANEXO 9: COLETA DO CONE ECTOPLACENTÁRIO.....	157
ANEXO 10: CULTIVO DO CONE ECTOPLACENTÁRIO.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

ADM - adrenomedulina
Ang-1 - angiopoetina 1
Ang-2 - angiopoetina 2
AP-2 γ - proteína gama 2 ativada
cAMP - adenosina monofosfato cíclica
Cdk - quinase ciclino-dependente
Cdx-2 - gene Cdx-2 homeobox
C-fos - proto-oncogene fos de reconhecimento
C-jun - produto proto-oncogene c-jun
COX-2 - cicloxigenase 2
CSF-1 - fator estimulatório de colônia 1
d/tPRP - proteína decidual/trofoblástica relacionada à prolactina
DAB - diaminobenzidina
DAMPs - padrões moleculares associados a perigo
DHEA - dehidroepiandrosterona
DHEA-s - sulfato de dehidroepiandrosterona
DNA - ácido desoxirribonucleico
E1 - estrona
E2 - 17 β -estradiol
E3 - estriol
eCG - gonadotropina coriônica equina
ECM - matriz extracelular
EGF - Fator de crescimento epidermal
eNOS - óxido nítrico sintetase endotelial
EOMES - gene T-box Eomesodermina
ER - receptor para estrógeno
ERVs - retrovírus endógenos
ETs-2 - proteína C-ets-2
FGF4 - fator de crescimento fibroblástico 4
FGFb - crescimento fibroblástico básico
Flk-1 - receptor 1 de domínio de inserção da quinase
Flt-1 - receptor 1 tirosina quinase semelhante a fms
FSH - hormônio folículo estimulante
Hand1 - proteína 1 expressa em derivados da crista neural e coração
hCG - gonadotrofina coriônica humana
HCMV - citomegalovírus humano inativado por ultravioleta
HGF - fator de crescimento de hepatócitos
HMGB1 - grupo de proteínas de alta mobilidade do tipo 1
HPT - eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano
Hsp - proteínas de choque térmico
IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-1 - interleucina 1
IL-10 - interleucina 10
IL-15 - interleucina 15
IL-1 α - interleucina 1 α
IL-1 β - interleucina 1 β
IL-2 - interleucina 2
IL-6 - interleucina 6
IL-8 - interleucina 8
INF γ - interferon gama

iNOS - óxido nítrico sintetase induzível
LH - hormônio luteinizante
LHRH - hormônio liberador de LH
LPS - lipopolissacarídeo
LTA - ácido lipoteicoico
Mash 2 - mammalian achaete scute-like homologue 2
MCP-1 - proteína quimiotática de monócito 1
MIF - fator inibidor da migração de macrófagos
MMP2 - metaloproteinase 2
MMP9 - metaloproteinase 9
MMPs - metaloproteinases
MyD88 - fator de diferenciação mieloide 88
NFκB - fator de transcrição nuclear kappa B
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintetase
Oct4 - fator de transcrição 4 ligado ao octâmero
PAI - inibidor do ativador de plasminogênio
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos
PCDH12 - protocaderina 12
PGF - fator de crescimento placentário
PGF2α - prostaglandina F2α
PGN - peptídeoglicano
PIBF - fator bloqueador induzido pela progesterona
PL - lactogênio placentário
PL-1 - lactogênio placentário 1
Plf - proliferin
PLP-A - proteína A semelhante à prolactina
PLP-E - proteína E semelhante à prolactina
PLP-F - proteína F semelhante à prolactina
PRL - prolactina
Prl3b1 - membro 1 da subfamília b da família 3 da prolactina
PRR - receptores de reconhecimento padrão
PTU – propiltiouracil
ROS - espécies reativas de oxigênio
rPlf - proteína relacionada ao proliferin
rT3 - T3 reverso
RT-PCR - reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
sFlt-1 - proteína Flt-1 solúvel
SHBG - globulina ligadora de hormônio sexual
SNK - Student-Neuman-Kells
T3 - triiodotironina
T4 - tiroxina
TBG - tireoglobulina
TGFβ - fator de crescimento transformante beta
TGFβ-1 - fator de crescimento transformante beta 1
Th-1 - T helper 1
Th-2 - T helper 2
Tie2 - receptor tirosina quinase 2
TIMPs - inibidores teciduais das metaloproteinases
TNFα - fator de necrose tumoral alfa
Tpbpa - proteína alfa específica de trofoblastos
TRH - hormônio liberador da tireotropina
TRIF - adaptador contendo um domínio Tir induzido pelo interferon beta
TSH - hormônio estimulador da tireoide

TTR - transtirretina
uNKs - células natural killer uterinas
uPA - ativador uroquinase do plasminogênio
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Perfis hormonais durante o ciclo estral em ratas (Juneo Freitas Silva).....	33
Figura 2.	A) Placenta discoide de rata. Evidenciação das três camadas que a compõe: Sinciotrofoblasto, Espongiotrofoblasto e Labirinto Placentário. (DE = decídua). B) Camadas da placenta de rata evidenciando seus componentes histológicos. (Coloração de Hematoxilina e eosina; Barra= A:360µm; B: sinciotrofoblasto:42µm; espongiotrofoblasto: 42µm; labirinto placentário: 27µm).....	35
Figura 3.	Desenvolvimento placentário em rata. A) Blastocisto (5,5° dg). B) Fase pós-implantação (7,5° dg). Diferenciação do trofoectoderma com formação das células gigantes ao redor do embrião e do cone ectoplacentário. C) Fase pós-implantação (8,5° dg). Formação do alantoide a partir do tronco posterior do epiblasto. D) Fase pré-placentária (10,5° dg). Formação do labirinto placentário a partir da fusão do mesoderma alantoideano com o ectoderma coriônico. E) Placenta definitiva (12° dg). Evidenciação da camada de células gigantes trofoblásticas, espongiotrofoblasto e labirinto placentário. (Juneo Freitas Silva).....	39

CAPÍTULO 2

Figura 1.	Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.....	57
Figura 2.	Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação (*P<0,05).....	60
Figura 3.	Expressão de INFy na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunistoquímicas da expressão de INFy (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm.) B e C) Redução da área e intensidade de expressão de INFy na camada do espongiotrofoblasto do grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle aos 14 e 19 dias de gestação. Aumento da área e intensidade de expressão de INFy no labirinto placentário do grupo tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	63
Figura 4.	Expressão de MIF na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunistoquímicas da expressão de MIF (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm). B e C) Aumento da área e intensidade de expressão de MIF na camada do espongiotrofoblasto dos grupos hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Redução no grupo hipotireoideo e aumento no grupo tratado com tiroxina da área e intensidade de expressão de MIF na camada do espongiotrofoblasto em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação (*P<0,05).....	65
Figura 5.	Expressão de iNOS na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunistoquímicas da expressão de iNOS (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm). B e C) Redução da área	67

	e intensidade de expressão de iNOS na camada do espongiotrofoblasto e labirinto placentário do grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Aumento da área e intensidade de expressão de iNOS no labirinto placentário do grupo tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. (*P<0,05).....	
Figura 6.	A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para TLR 2 (A) e 4 (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	69
Figura 7.	A, B e C) Expressão relativa de transcritos gênicos para INF γ (A), MIF (B) e TNF α (C) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	71
Figura 8.	A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para IL-10 (A) e iNOS (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	72

CAPÍTULO 3

Figura 1	Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.....	77
Figura 2	Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	80
Figura 3	Expressão de VEGF na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 14 e 19 dias de gestação. A) A) Imagens imunoistoquímicas da expressão de VEGF (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12 μ m). B e C) Aumento da área de expressão de VEGF na camada do espongiotrofoblasto no grupo hipotireoideo em comparação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Redução da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto nos animais com hipotireoidismo em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação. Redução da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de VEGF no labirinto placentário dos animais com hipotireoidismo em comparação às ratas controle. Ratas tratadas com tiroxina com redução da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto aos 14 e 19 dias de gestação em comparação com as ratas controle. (*P<0,05).....	83
Figura 4	Expressão de Flk-1 na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunoistoquímicas da expressão de Flk-1 (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12 μ m.) B e C) Aumento da área e intensidade de expressão de Flk-1 na camada do espongiotrofoblasto do grupo hipotireoideo em comparação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. (*P<0,05).....	85
Figura 5	A-D) Expressão relativa de transcritos gênicos para VEGF(A), Flk-1 (B), PGF (C) e sFlt-1 (D) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 10, 14 e 19 dias de gestação (*P<0,05).....	87
Figura 6	A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para PL-1(A) e rPlf (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 10, 14 e 19 dias de gestação (*P<0,05).....	88

CAPÍTULO 4

Figura 1	Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.....	94
Figura 2	Histomorfometria da migração trofoblástica intrauterina endovascular e intersticial.....	96
Figura 3	Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação. (*P<0,05).....	98
Figura 4	A e B) Index (média±DP) de migração endovascular (A) e intersticial (B) das células trofoblásticas na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação. (*P<0,05).....	98
Figura 5	Imagens de imunistoquímica representando a cinética de migração das células trofoblásticas endovascular e intersticial na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 (A-C), 15 (D-F), 16 (G-I), 17 (J-L) e 18 (M-O) dias de gestação. G-I) Invasão trofoblástica endovascular menor nas ratas do grupo hipotireoideo (H) em relação ao grupo controle (G) aos 16 dias de gestação. J-L) Menor invasão trofoblástica intersticial nas ratas do grupo hipotireoideo (K) em relação ao grupo controle (J) aos 17 dias de gestação. M-O) Menor invasão trofoblástica intersticial nas ratas do grupo tratado com tiroxina (O) em relação ao grupo controle (M) aos 18 dias de gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, Barra = 360µm).....	99
Figura 6	A, B e C) Expressão relativa de transcritos gênicos para MMP2 (A) MMP9 (B) e leptina placentária (C) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 10, 14 e 18 dias de gestação. (*P<0,05)...	102

CAPÍTULO 5

Figura 1	Expressão gênica (média±DP) de Tpbp, Prl3b1, VEGF, PGF, INFy e PL-1 nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10-9 M de T3, 10-7 M de T3 e 10-4 M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo. A) Expressão relativa de transcritos gênicos para Tpbp e Prl3b1. B) Expressão relativa de transcritos gênicos para VEGF e PGF. C) Expressão relativa de transcritos gênicos para INFy e PL-1. (*P<0,05).....	109
----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Efeitos das disfunções tireoidianas durante a gestação.....	51
-----------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real...	60
Tabela 2.	Efeitos do hipotireoidismo e excesso de T4 na expressão de receptores <i>toll like</i> e mediadores inflamatórios na placenta de ratas em relação ao grupo controle.....	73

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real...	80
Tabela 2.	Efeitos do hipotireoidismo e excesso de T4 na expressão de fatores angiogênicos e hormonais na placenta de ratas em relação ao grupo controle.....	89

CAPÍTULO 4

Tabela 1.	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real...	97
-----------	--	----

CAPÍTULO 5

Tabela 1.	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real...	108
-----------	--	-----

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* a migração trofoblástica intrauterina e a expressão gênica e proteica de fatores envolvidos no perfil imunológico, angiogênico e endócrino da placenta de ratas com hipotireoidismo e tratadas com L-tiroxina, como também a diferenciação e expressão gênica *in vitro* de fatores hormonais, angiogênicos e imunes em células trofoblásticas de camundongo com diferentes doses de T3. O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil. No experimento *in vivo* os animais foram eutanasiados com 10, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 dias de gestação. Avaliou-se a cinética de migração trofoblástica endovascular e intersticial e a expressão imunistoquímica de INF γ , MIF, iNOS, VEGF e Flk-1 nos discos placentários. A expressão gênica de TLR2, TLR4, INF γ , MIF, TNF α , IL-10, iNOS, PL-1, VEGF, Flk-1, PGF, rPlf, sFlt1, MMP2, MMP9 e leptina placentária na placenta foi avaliada pela RT-PCR tempo real. No experimento *in vitro* os animais foram eutanasiados com 7,5 dias de gestação para a extração e o cultivo do cone ectoplacentário durante 24 e 48 horas em meio padrão sem T3 (controle) e com diferentes doses de T3 (10^{-4} M, 10^{-7} M, 10^{-9} M). A expressão gênica de Tpbp, Prl3b1, VEGF, PGF, PL-1 e INF γ pelas células trofoblásticas foi avaliada pela RT-PCR tempo real. Os dados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram analisados pelo teste SNK. O hipotireoidismo reduziu a migração trofoblástica endovascular e intersticial e a expressão gênica e/ou proteica de TLR4, de fatores pró (INF γ) e anti-inflamatórias (IL-10, iNOS), de fatores pró-angiogênicos (VEGF, PGF) e hormonais (PL-1) e das MMPs 2 e 9 e de leptina placentária ($P < 0,05$). O hipotireoidismo também aumentou a expressão gênica e/ou proteica de TLR2 e Flk-1 aos 14 dias de gestação, mas diminuiu a expressão gênica de Flk-1 no dia 10 ($P < 0,05$). Em relação à expressão gênica de rPlf, o hipotireoidismo aumentou aos 10 e 19 dias de gestação, mas reduziu no dia 14, enquanto nas ratas tratadas com T4 aumentou aos 19 dias de gestação ($P < 0,05$). O excesso de T4 não só aumentou a expressão gênica e/ou proteica dos fatores anti-inflamatórios IL-10 e iNOS e de fatores pró-angiogênicos (VEGF, PGF) e hormonais (PL-1), como reduziu, aos 10 dias, a expressão de fatores pró-inflamatórias (TNF α e MIF) ($P < 0,05$). No entanto, aos 19 dias de gestação, os fatores pró-inflamatórios INF γ e MIF aumentaram nas ratas tratadas com T4, ao contrário dos fatores angiogênicos VEGF, Flk-1 e sFlt-1, que diminuíram ($P < 0,05$). O excesso de T4 aumentou a expressão gênica de MMP-2 aos 10 dias de gestação ($P < 0,05$), mas reduziu a migração trofoblástica endovascular aos 18 dias de gestação ($P < 0,05$). *In vitro*, as doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram a expressão do mRNA nas células trofoblásticas para Tpbp, PGF, INF γ e PL-1, com 24 e/ou 48 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-7} M de T3 também aumentou a expressão gênica de VEGF e Pl3b1 ($P < 0,05$). A dose de 10^{-4} M de T3, pelo contrário, reduziu a expressão gênica de PL-1 e VEGF ($P < 0,05$). Conclui-se que as disfunções tireoidianas maternas reduzem a migração trofoblástica intrauterina e afetam diferentemente o perfil imunológico, angiogênico e endócrino da placenta de ratas, sendo estes efeitos dependentes do período gestacional. Além disso, a triiodotironina afeta a expressão gênica *in vitro* de fatores envolvidos com a diferenciação e a atividade hormonal, angiogênica e imune de células trofoblásticas de camundongos, sendo estes efeitos dose-dependentes.

Palavras-chave: disfunção tireoidiana, trofoblasto, imunologia, angiogênese, migração, rata, camundongo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vivo* the intrauterine trophoblast migration and the gene and protein expression of factors involved in the immune, endocrine and angiogenic profile of the placentas in hypothyroid and L-thyroxine-treated rats, as well as the differentiation and gene expression *in vitro* of hormonal, angiogenic and immune factors in mouse trophoblast cells with different doses of T3. The hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil. In the experiment *in vivo*, the animals were euthanized at 10, 14, 15, 16, 17, 18, and 19 days of gestation. We evaluated the endovascular and interstitial trophoblast migration and the immunohistochemical expression of INF γ , MIF, iNOS, VEGF and Flk-1 in placental discs. The gene expression of TLR2, TLR4, INF γ , MIF, TNF α , IL10, iNOS, PL-1, VEGF, Flk-1, PGF, rPlf, sFlt1, MMP2, MMP9 and placental leptin in the placenta was evaluated by real-time RT-PCR. For the experiment *in vitro* the animals were euthanized with 7.5 days of gestation to extraction and culture of the ectoplacental cone for 24 and 48 hours in standard medium without T3 (control) and with different doses of T3 (10^{-4} M, 10^{-7} M, 10^{-9} M). The gene expression of Tpbp, Prl3b1, VEGF, PGF, PL-1, and INF γ in the trophoblast cells was evaluated by real-time RT-PCR. Data from experiments *in vivo* and *in vitro* were analyzed by SNK test. Hypothyroidism reduced the endovascular and interstitial trophoblast migration and the gene and/or protein expression of TLR4, of pro- (INF γ) and anti-inflammatory (IL-10, iNOS) factors, of pro-angiogenic (VEGF, PGF) and hormonal (PL-1) factors and of the MMPs 2 and 9 and placental leptin ($P < 0.05$). Hypothyroidism also increased the gene and/or protein expression of TLR2 and Flk-1 at 14 days of gestation, but decreased the gene expression of Flk-1 on day 10 ($P < 0.05$). Regarding gene expression of rPlf, hypothyroidism increased at 10 and 19 days of gestation, but decreased on day 14, whereas excess of T4 increased at 19 days of gestation ($P < 0.05$). Excess of T4 not only increased the gene and/or protein expression of the anti-inflammatory factors IL-10 and iNOS and pro-angiogenic (VEGF, PGF) and hormonal (PL-1) factors, as reduced on day 10 the expression of the pro-inflammatory factors TNF α and MIF ($P < 0.05$). However, at 19 days of gestation, the pro-inflammatory factors MIF and INF γ increased in T4-treated rats, unlike of the angiogenic factors VEGF, sFlt-1 and Flk-1, which decreased ($P < 0.05$). Excess of T4 increased the gene expression of MMP-2 at 10 days of gestation, but reduced the endovascular trophoblast migration at 18 days of gestation ($P < 0.05$). *In vitro*, the doses of 10^{-7} and 10^{-9} M of T3 increased the mRNA expression in the trophoblast cells for Tpbp, PGF, INF γ , and PL-1 with 24 and/or 48 hours of culture ($P < 0.05$). The dose of 10^{-7} M of T3 also increased the gene expression for VEGF and Pl3b1 ($P < 0.05$). The dose of 10^{-4} M of T3, on the contrary, reduced the gene expression for PL-1 and VEGF ($P < 0.05$). We conclude that maternal thyroid dysfunction reduce the intrauterine trophoblast migration and differently affect the immune, endocrine and angiogenic profile in the placenta of rats, and these effects are dependent of the gestational period. Furthermore, triiodothyronine affects the gene expression *in vitro* of factors involved with the differentiation and hormonal, angiogenic and immune activity of mouse trophoblastic cells and these effects are dose-dependent.

Keywords: thyroid dysfunction, trophoblast, immunology, angiogenesis, migration, rat, mouse.

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são vitais para a função reprodutiva normal. Durante o desenvolvimento da placenta um número de processos celulares complexos que incluem proliferação, diferenciação, migração celular e angiogênese estão envolvidos na diferenciação e função desse órgão (Cross, 2005). No entanto, como o desenvolvimento da placenta depende da interação de vários fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, as disfunções tireoidianas têm resultado em comprometimento da fertilidade tanto em humanos como em algumas espécies de animais domésticos (Choksi *et al.*, 2003).

Inicialmente, acreditava-se que a infertilidade decorrente do quadro de hipotireoidismo fosse resultado principalmente da interferência direta com a função ovariana normal. No entanto, a hipofunção tireoidiana também afeta o desenvolvimento feto-placentário por prejudicar a decidualização durante a implantação embrionária (Galton *et al.*, 2001), por alterar os estoques de glicogênio placentário (Shafrir *et al.*, 1994), por afetar a expressão de *c-fos* e *c-jun* em ratas gestantes (Morrish *et al.*, 1997) e por aumentar a apoptose e reduzir a proliferação das células trofoblásticas (Silva *et al.*, 2012). Alterações na apoptose e proliferação dessas células também já foram observadas em outros distúrbios gestacionais em humanos como na pré-eclâmpsia (Hayakawa *et al.*, 1995) e na restrição de crescimento intra-uterino (Smith *et al.*, 1997).

Já em relação ao hipertireoidismo, foi comprovado que a hiperfunção tireoidiana aumenta a eficiência reprodutiva em modelos animais experimentais (Serakides *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007) e que a administração de tiroxina em ratas gestantes aumenta a proliferação das células trofoblásticas (Freitas *et al.*, 2007). Em marrãs, o hipertireoidismo aumenta a vascularização uterina e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela placenta (Souza *et al.*, 2011). Além disso, verificou-se *in vitro* que a triiodotironina (T3) suprime a apoptose e aumenta a expressão de metaloproteínas e integrinas bem como a função endócrina do trofoblasto extraviloso humano (Maruo *et al.*, 1987; Oki *et al.*, 2004). Apesar de ter sido provado que alterações na diferenciação e na função das células

trofoblásticas estejam envolvidas na patogênese das principais patologias da gestação em humanos (Vonnahme *et al.*, 2008), até o momento, nenhum estudo procurou elucidar se a gênese das alterações placentárias resultantes das disfunções tireoidianas envolve mudanças na atividade e na capacidade de diferenciação das células trofoblásticas.

Durante a implantação, as células tronco trofoblásticas, presentes no cone ectoplacentário e no trofoectoderma mural, infiltram-se no endométrio e se diferenciam em distintas populações de células trofoblásticas com funções específicas (Cross, 2005; Asanoma *et al.*, 2011). Entre os subtipos celulares encontram-se, na rata e no camundongo, as células gigantes trofoblásticas, os espongiotrofoblastos, as células de glicogênio, os trofoblastos invasores e as células trofoblásticas do labirinto placentário. Todas elas são fontes de fatores de crescimento e de sinalização críticos para o crescimento e para a função útero-placentária (Oda *et al.*, 2006).

Em um estudo conduzido por Silva *et al.* (2012) verificou-se que a placenta de ratas com hipotireoidismo apresenta alteração na população de células de glicogênio, como também na de células gigantes trofoblásticas, o que sugere uma falha na cinética de migração dessas células em direção à decídua. É importante ressaltar que uma redução da invasão trofoblástica na decídua compromete a vascularização na interface materno-fetal, resultando em estresse oxidativo na placenta. Isso tem sido implicado na patogênese de muitas complicações da gestação humana, incluindo a pré-eclâmpsia, o aborto espontâneo e o parto prematuro (Burdon *et al.*, 2007).

Algumas citocinas, fatores de crescimento e hormônios, representadas pelas metaloproteínas, leptina placentária, fator estimulatório de colônia 1 (CSF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1) controlam a invasão das células trofoblásticas em direção a decídua (Ain *et al.*, 2003). No entanto, ainda há poucas informações sobre como estes fatores influenciam a dinâmica das células trofoblásticas na interface materno-fetal. A falha na cinética de migração das células trofoblásticas no hipotireoidismo necessita ser comprovada,

bem como a participação das metaloproteinases nesse processo *in vivo*, já que *in vitro* a expressão de metaloproteinases pelas células trofoblásticas é responsiva a triiodotironina (Oki *et al.*, 2004). Uma das hipóteses do presente trabalho é de que o hipo e hipertireoidismo alteram a função placentária por afetar a diferenciação das células trofoblásticas e, por conseguinte, a cinética de migração dessas células.

As primeiras células a se diferenciarem a partir das células tronco trofoblásticas são as células gigantes trofoblásticas, que são de vital importância para a implantação embrionária e para a adaptação materna na gestação. Elas produzem, junto com os espongiotrofoblastos, hormônios, citocinas e fatores de crescimento cruciais para a manutenção e regulação da interface materno-fetal (Hu e Cross, 2010). Dentre os hormônios, destaca-se o lactogênio placentário 1 (PL-1), importante para o desenvolvimento mamário, manutenção da síntese de progesterona pelo ovário e secreção de insulina durante a gestação (Cross *et al.*, 2002; Cross, 2005). As células gigantes trofoblásticas também produzem fatores parácrinos que vão influenciar o desenvolvimento vascular placentário. Dentre eles, o proliferin (Plf), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PGF) estimulam a angiogênese placentária. Este efeito é antagonizado pela proteína relacionada ao proliferin (rPlf) e pela proteína Flt-1 solúvel (sFlt-1) sintetizadas pelo espongiotrofoblasto (Maynard *et al.*, 2003; Plaisier *et al.*, 2009).

A angiogênese placentária é de fundamental importância para a manutenção da gestação uma vez que está envolvida desde a implantação embrionária e decidualização até a formação definitiva da placenta (Reynolds *et al.*, 2010). A ocorrência de aborto espontâneo e de pré-eclâmpsia em mulheres têm sido associada a alterações no desenvolvimento vascular da placenta, particularmente na expressão do VEGF (Redmer *et al.*, 2005; Vonnahme *et al.*, 2008). Além disso, o PGF é amplamente expresso na placenta humana podendo ser um mediador autócrino da função trofoblástica (Sherer e Abulafia, 2001; Plaisier *et al.*, 2007). Com base nisso, ainda não se sabe se as disfunções tireoidianas podem afetar a função do trofoblasto em promover o desenvolvimento vascular adequado do tecido placentário. Outra hipótese

deste trabalho é de que a célula trofoblástica, sob condições de hipotireoidismo ou excesso de T4, apresenta alteração na expressão de fatores pró- e anti-angiogênicos com consequente alteração da vascularização placentária.

Além da função endócrina e angiogênica, as células trofoblásticas, particularmente as células gigantes trofoblásticas, também produzem interferon-gama (INF- γ), que afeta diretamente a função das células *Natural Killer* uterinas (uNKs) envolvidas na função imune placentária como também na dinâmica vascular (Hu e Cross, 2010). Vale salientar que o trofoblasto também está entre os alvos do INF-y, sendo que a diferenciação, sobrevivência e renovação das células trofoblásticas *in vitro* são afetadas pelo INF-y (Athanasakis *et al.*, 2000; Ain *et al.*, 2003).

Durante a gestação ocorre supressão do sistema imune, caracterizada por redução significativa da imunidade celular (Weinberg, 1987; Raghupathy, 1997). Isso é crucial para prevenir a rejeição ao feto (Murphy *et al.*, 2004). Contudo, embora previna a sua rejeição, aumenta a susceptibilidade do feto a diversos agentes infecciosos (Kim *et al.*, 2005).

Tem sido mostrado que o INF-y é um importante componente da resposta imune no tecido placentário e que sua síntese varia no decorrer da gestação, contribuindo para a resposta imunológica por sua habilidade de estimular a atividade fagocitária de macrófagos e de células gigantes trofoblásticas contra microorganismos (Kim *et al.*, 2005; Ashkar *et al.*, 2000). Além disso, após o início da implantação, a fagocitose realizada pelas células gigantes trofoblásticas participa não só da nutrição do feto antes da completa formação da placenta como também na aquisição de espaço no tecido endometrial para que o embrião possa se acomodar e se desenvolver (Bevilacqua e Abrahamsohn, 1994).

No homem e nas espécies animais domésticas, a resposta imune inata contra microorganismos na interface materno-fetal pode ter um impacto significativo sobre o sucesso da gestação, uma vez que infecções intrauterinas têm se mostrado fortemente associadas com certos distúrbios metabólicos da gestação. O reconhecimento de antígenos bacterianos pelas células trofoblásticas é mediado por vários receptores de membrana,

sendo que receptores Toll-like (TLRs), cuja expressão varia com o estágio da gestação, tem sido identificados como os principais receptores que reconhecem diferentes padrões moleculares associados a patógenos (Flo *et al.*, 2002). Contudo, pouco se sabe sobre a influência das disfunções tireoidianas na resposta imunológica geral (Gomes *et al.*, 2008) e, particularmente, no sistema imune placentário. Associado a isso, tem sido visto que os TLRs estão associados a complicações gestacionais, particularmente na patogênese da pré-eclâmpsia, do parto prematuro e até mesmo na falha do desenvolvimento fetal (Koga e Mor, 2010; Xie *et al.*, 2010). Outra hipótese deste trabalho é de que o perfil imunológico das células trofoblásticas esteja comprometido no hipotireoidismo. Além disso, vale ressaltar que o INF- γ e outras citocinas pró e anti-inflamatórias podem também influenciar indiretamente a invasão das células trofoblásticas em direção à decidua através dos seus efeitos no remodelamento da matriz extracelular e no compartimento vascular da decidua mesometrial (Ain *et al.*, 2003). Assim, alteração na expressão de citocinas inflamatórias na interface materno-fetal em animais com hipotireoidismo também pode corroborar com a falha na cinética de migração das células trofoblásticas, o que constitui uma das hipóteses deste trabalho.

Apesar das disfunções tireoidianas serem amplamente estudadas, há total carência de informações sobre o seu efeito na diferenciação das células trofoblásticas como também no perfil angiogênico, endócrino e imune da placenta. Vale ressaltar que muitos genes envolvidos na diferenciação e função das células trofoblásticas são similares entre roedores e humanos, de modo que o estudo das células trofoblásticas de ratas e

camundongos pode servir de modelo para a compreensão e terapêutica dos distúrbios gestacionais em humanos e animais (Hu e Cross, 2010), particularmente no que se refere à utilização potencial dessas células para a correção de defeitos placentários.

OBJETIVOS

Avaliar o perfil imunológico da placenta de ratas com hipotireoidismo e excesso de T4 pela expressão de mRNA de INF γ , MIF, IL-10, TNF α , iNOS e receptores Toll-like 2 e 4 e pela expressão imunistoquímica de INF γ , MIF e iNOS (Capítulo 2).

Avaliar o perfil angiogênico e endócrino da placenta de ratas com hipotireoidismo e excesso de T4 pela expressão de mRNA de VEGF, Flk-1, PGF, sFlt-1, PL-1 e rPlf e pela expressão imunistoquímica de VEGF e Flk-1 (Capítulo 3).

Estudar a cinética de migração trofoblástica intrauterina em ratas com hipotireoidismo e excesso de T4 e a expressão de mRNA para as metaloproteinases 2 e 9 e leptina placentária (Capítulo 4).

Estudar o efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação das células trofoblásticas de camundongos e na expressão de mRNA para VEGF, PGF, PL-1 e INF- γ (Capítulo 5).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Reprodução da rata

O ciclo reprodutivo da rata é poliestrá e com ovulação espontânea. A rata atinge a maturidade sexual com 65 dias e até a idade de 12 meses o comprimento médio do ciclo estral é de quatro dias (Freeman, 1988; Freeman, 1994; Marcondes, 1996), sendo os estágios do ciclo ovariano caracterizados como proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II) (Freeman, 1988). O aparecimento e duração destes estágios são dependentes do fotoperíodo (Freeman, 1994).

Diferente das espécies domésticas, o ciclo estral da rata é caracterizado por uma curta fase luteal, sendo que a ovulação ocorre a partir do início do proestro até o final do estro (Young *et al.*, 1941; Schwartz, 1964). Caso não ocorra a cópula, o corpo lúteo formado a partir desta ovulação secretará baixos níveis de progesterona por um ou dois dias. Por outro lado, caso as ratas copulem e se tornem gestantes, ou se elas copulam com machos inférteis ou, ainda, na presença de um estímulo artificial na cérvix, a

adenohipófise secreta quantidades suficientes de prolactina para manter o corpo lúteo por mais dias (Freeman, 1994). Caso sejam fecundadas, a fase luteal persiste por 20 a 22 dias, que corresponde ao período gestacional da rata. Entretanto, se a cópula é infértil ou artificial, o corpo lúteo persiste por 12 a 14 dias, período conhecido como pseudogestação (Freeman, 1994).

Durante o ciclo estral, os níveis séricos de prolactina e dos hormônios gonadotrópicos hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e estão baixos no início do proestro, mas aumentam ao final deste período. As concentrações de estradiol começam a aumentar no meio do diestro, alcançam as maiores concentrações durante o proestro e retornam às concentrações basais no estro. A secreção de progesterona pelo corpo lúteo também aumenta durante o metaestro e diestro e diminui logo em seguida. Contudo, ao final do proestro, as concentrações séricas de progesterona atingem o seu segundo pico durante o ciclo estral (Smith *et al.*, 1975) (Figura 1).

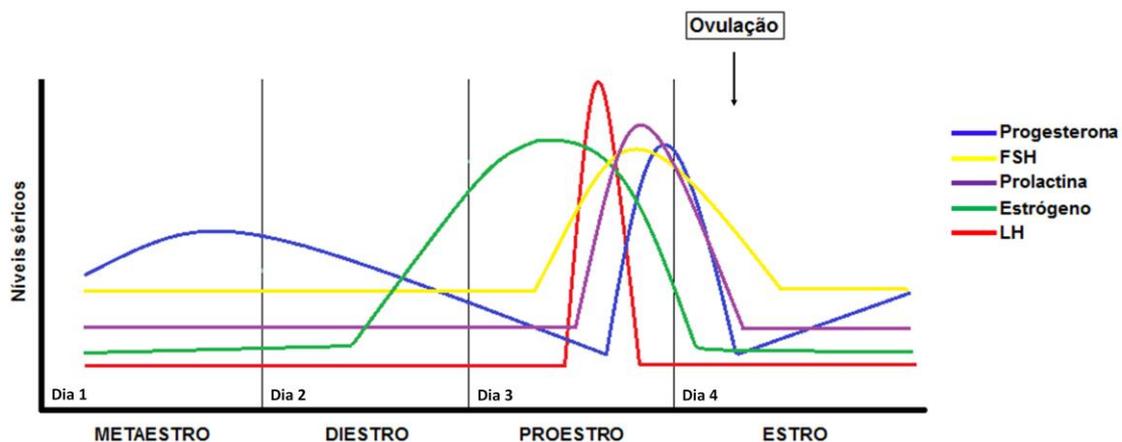


Figura 1. Perfis hormonais durante o ciclo estral em ratas (Juneo Freitas Silva).

Caso a rata se torne gestante, as concentrações séricas de progesterona se mantêm elevadas durante toda a gestação, com maiores valores

entre os dias 10 e 16 de gestação (Niswender *et al.*, 1994). A manutenção da produção de progesterona pelo corpo lúteo, durante todo o

período gestacional, dependerá da prolactina adenohipofisária e dos hormônios relacionados à prolactina, produzidos pela placenta, principalmente na segunda metade da gestação (Linzer e Fisher, 1999).

2. Placentação

A placenta é um órgão que estabelece a interface materno-fetal visando a troca seletiva de nutrientes, gases, metabólitos e hormônios entre a mãe e o feto, além de exercer funções endócrinas, cardiovasculares e imunológicas necessárias para a sobrevivência e o crescimento fetal (Cross, 2005).

Nos mamíferos com placentação epiteliocorial (peixes-boi, baleias, equinos, suínos e ruminantes), o corioalantoide é pouco invasivo, de forma que o epitélio uterino permanece intacto durante a gestação (Reynolds *et al.*, 2010). Já os embriões de outros mamíferos penetram o epitélio uterino e a lâmina basal com a finalidade de estabelecer uma relação vascular definitiva com a mãe. Dessa forma, apresentam uma placentação endoteliocorial (carnívoros) ou hemocorial (humanos, primatas e roedores). No entanto, esse processo varia consideravelmente de espécie para espécie no que diz respeito ao período de implantação, morfogênese útero-placentária e suas características citológicas (Weitlauf, 1994).

A formação de uma placenta hemocorial é um processo dinâmico que envolve a expansão de populações de células progenitoras capazes de se diferenciar em linhagens trofoblásticas distintas. Células trofoblásticas maduras exibem propriedades migratórias e invasivas e possuem a capacidade de reconhecer, modificar e estimular o comportamento de outros tipos celulares dentro da interface materno-fetal (Faria *et al.*, 2010).

Alterações ou respostas inadequadas dentro das vias regulatórias que controlam o desenvolvimento placentário podem impactar negativamente não só na saúde da mãe como também no desenvolvimento fetal e na vida pós-natal. No entanto, existem semelhanças

interessantes entre as espécies que possuem placentação hemocorial. A seleção genética positiva resultou na conservação de genes que regulam a placentação dos mamíferos, de modo que a rata tem sido um modelo animal útil para estudar muitos aspectos da placentação (Soares *et al.*, 2012).

Após a implantação, particularmente na rata, o embrião é completamente revestido por diferentes tipos de células trofoblásticas com localização espacial e expressão gênica distintas. A placenta definitiva é discoide e se estabelece por volta do 12º dia de gestação (Figura 2). Ela possui anatomicamente e fisiologicamente três regiões distintas: o labirinto placentário, que é a maior porção do disco placentário e formado pela fusão do alantoide com o córion; a zona juncional ou trofoespôngio, compreendido pelo espongiotrofoblasto e células de glicogênio, que é formado da parede original do blastocisto e permanece unicelular; e o sinciotrofoblasto, também chamado de camada de células gigantes trofoblásticas, que é formado a partir da penetração das células trofoblásticas no endométrio (Cross, 2000; Hemberger e Cross, 2001; Burdon *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010).

O labirinto placentário é a principal área de intercâmbio materno-fetal e consiste de uma malha de sangue materno delimitada por células trofoblásticas. Ele contém células trofoblásticas, células de origem mesodérmica e do estroma e vasos sanguíneos, que se ramificam para produzir uma grande área de superfície para trocas gasosas e de nutrientes (Wooding e Flint, 1994; Burdon *et al.*, 2007).

A zona juncional, camada média, é um compartimento constituído por pelo menos dois subtipos celulares: o espongiotrofoblasto e as células de glicogênio (Coan *et al.*, 2006; Burdon *et al.*, 2007). O espongiotrofoblasto consiste de células ovoides e mononucleares (Junqueira e Carneiro, 1995), enquanto as células de glicogênio, que aparecem na placenta a partir do 12º dia de gestação, são caracterizadas por possuir um núcleo mais condensado e o citoplasma com grânulos de glicogênio (Wooding e Flint, 1994; Burdon *et al.*, 2007).

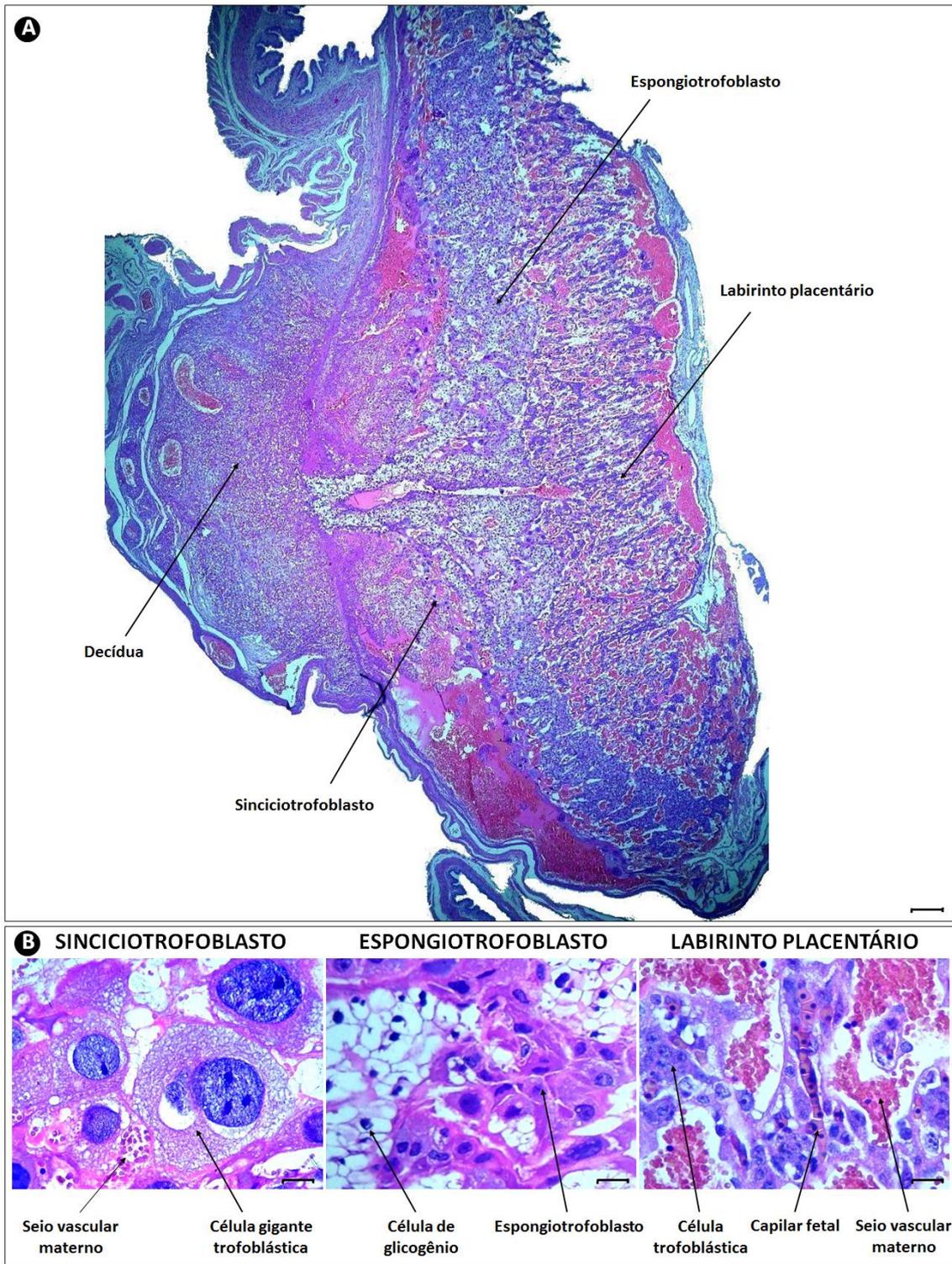


Figura 2. A) Placenta discoide de rata. Evidenciação das três camadas que a compõe: Sinciotrofoblasto, Espongiotrofoblasto e Labirinto Placentário. (DE = decídua). B) Camadas da placenta de rata evidenciando seus componentes histológicos. (Coloração de Hematoxilina e eosina; Barra= A:360 μ m; B: sinciotrofoblasto:42 μ m; espongiotrofoblasto: 42 μ m; labirinto placentário: 27 μ m)

O espongiotrofoblasto atua como um compartimento glandular endócrino para manter a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, além de outras funções. O espongiotrofoblasto e, secundariamente, o sincitiotrofoblasto, produzem hormônios luteotróficos e lactogênicos durante a gestação. Esses hormônios pertencem à família dos hormônios estruturalmente relacionados à prolactina adenohipofisária (PRL), proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) e citocinas (Ain *et al.*, 2003; Malassiné *et al.*, 2003; Cross, 2005; Coan *et al.*, 2006). Outra suposta função para o espongiotrofoblasto é a de limitar o crescimento do endotélio materno na placenta fetal, pela secreção de fatores anti-angiogênicos como as proteínas Flt1 solúvel (sFlt-1) e as relacionadas à proliferin (rPlf) (He *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2002). Em casos de alteração do desenvolvimento placentário, há mudança qualitativa no equilíbrio entre as células do espongiotrofoblasto e as células de glicogênio (Milstone *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Coan *et al.*, 2006).

As células de glicogênio são células trofoblásticas de origem incerta que surgem no espongiotrofoblasto. Acredita-se que elas se originem do espongiotrofoblasto por expressar um gene específico do espongiotrofoblasto (*4311*) (Georgiades *et al.*, 2001; Adamson *et al.*, 2002). No entanto, há evidências que as células de glicogênio podem ser distintas das do espongiotrofoblasto uma vez que expressam protocaderina 12 (PCDH12), um marcador específico de um grupo celular distinto das que dão origem às células do espongiotrofoblasto no cone ectoplacentário (Rampon *et al.*, 2005; Bouillot *et al.*, 2006).

Admite-se também que as células de glicogênio sejam análogas às do trofoblasto extraviloso invasivo humano, isto é, elas invadem as artérias espiraladas uterinas que levam sangue ao local da implantação e remodelam a parede muscular arterial. Esse processo resulta em maior fluxo de sangue, oxigênio e nutrientes para o local da implantação. Em ratas, as células de glicogênio invadem a decídua materna e podem se fundir ou interagir com as células *natural killer* uterinas (uNKs) estimulando-as a modificar as artérias espiraladas (Croy *et al.*, 2000). Uma vez na decídua, as células de glicogênio entram em um processo citolítico liberando seus componentes intracelulares, glicogênio e hormônios, para o

interstício. É provável que esses componentes sejam importantes como fonte de energia e para o controle hormonal da gestação e/ou do feto (Bouillot *et al.*, 2006). Mann *et al.* (2003) também demonstraram em camundongos alto nível de expressão de cicloxigenases nas células de glicogênio no final da gestação, suspeitando do seu envolvimento para a ocorrência do parto. As cicloxigenases são marcadores de estresse oxidativo por indicar lesão de hipóxia-reoxigenação, que pode ser parte do processo de trabalho de parto (Mann *et al.*, 2003).

No final da gestação foi verificado que as uNKs aumentam a expressão de marcadores de apoptose e entram em apoptose. No terço final da gestação de ratas, algumas dessas células apresentam fragmentação do DNA e binucleação, sugerindo falha na citocinese (Delgado *et al.*, 1996). Além disso, apresentam aumento do volume citoplasmático com degranulação, sugerindo apoptose e/ou necrose. No terço final da gestação de camundongos, acredita-se que o $INF\gamma$ desempenhe papel autócrino na indução da morte das uNKs (Croy *et al.*, 2002), e que a granzima B possa estar envolvida também, já que ela pode induzir apoptose pela ativação das caspases (Adrian e Martin, 2001).

Na rata, as células uNKs estão localizadas no triângulo metrial e em torno da artéria mesometrial principal, que é invadida pelo trofoblasto endovascular. Assim, postula-se que as células uNKs estejam envolvidas no aumento do fluxo sanguíneo placentário. A morte delas, com liberação de seus grânulos, apresenta impacto sobre a matriz extracelular e as células musculares lisas da parede vascular, permitindo a vasodilatação. Além disso, o aumento do fluxo sanguíneo placentário ocorre a partir do 12º dia de gestação, período que corresponde à perda dessas células (Correia-da-Silva *et al.*, 2004).

Contudo, células trofoblásticas invasoras, que se originam da zona juncional, também participam do remodelamento vascular que ocorre no compartimento mesometrial uterino. Essas células envolvem e penetram as artérias espiraladas uterinas. As células trofoblásticas invasoras com fenótipo endovascular substituem o endotélio, enquanto as intersticiais se localizam entre os vasos sanguíneos (Ain *et al.*, 2003; Caluwaerts *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2007).

Antes dos 13,5 dias de gestação, a invasão das células trofoblásticas é limitada ao ambiente endovascular e está confinada à decídua mesometrial. Após 14,5 dias de gestação, os trofoblastos endovascular e intersticial já podem ser identificados dentro da glândula metrial (Ain *et al.*, 2003; Rosario *et al.*, 2008). Pesquisas têm demonstrado que as artérias presentes na interface materno-fetal começam a se dilatar quando estão próximas dos trofoblastos intersticiais que expressam óxido nítrico sintetase (NOS), óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e, possivelmente, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (Kaufmann *et al.*, 2004). Além disso, Cartwright *et al.* (1999) demonstraram que a motilidade celular e a invasão trofoblástica *in vitro* são fortemente dependentes da NOS produzida pelo próprio trofoblasto. A coordenação precisa de todo o processo de remodelamento vascular uterino é fundamental para garantir a entrega adequada de nutrientes para o feto e evitar a exposição inadequada do feto aos efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (Burton, 2009). Falhas no remodelamento vascular uterino tem sido associadas a patologias gestacionais como a pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino e parto prematuro (Rosario *et al.*, 2008).

O sinciotrofoblasto está localizado mais externamente na periferia da unidade fetoplacentária. Ele é constituído por células gigantes trofoblásticas que possuem núcleos volumosos ou mais de um núcleo, formando um sincício. Este sincício é resultante da fusão das células trofoblásticas (Junqueira e Carneiro, 1995). As células gigantes trofoblásticas são as primeiras células a mediar o processo de implantação e invasão uterina pelo conceito. Mais tarde, elas produzem diversos hormônios e citocinas que regulam o fluxo de sangue materno para o local da implantação, a síntese ovariana de progesterona e a lactogênese (Cross *et al.*, 2002; Cross, 2005). A maioria das células gigantes trofoblásticas migra para a decídua. No entanto, recentemente, foi encontrado na placenta de roedores e primatas um subtipo de célula trofoblástica gigante que invade as artérias espiraladas que trazem o sangue materno para o local da implantação (Adamson *et al.*, 2002). Baseado nessas evidências, hoje se sabe que as células gigantes trofoblásticas participam do desenvolvimento vascular placentário (Cross *et al.*, 2002).

2.1. Diferenciação trofoblástica

A placenta hemocorial da rata desenvolve-se a partir de células-tronco presentes no ectoderma extraembrionário, um derivado da camada celular externa do blastocisto denominado trofoectoderma. O trofoectoderma, que infiltra no epitélio endometrial, se diferencia em uma variedade de subtipos celulares, cada um com funções específicas (Cross, 2005). O trofoectoderma não contribui para a formação de nenhum tecido fetal, mas contribui para a formação da placenta e dos demais anexos embrionários. Sua proliferação e diferenciação o tornam o maior componente da placenta (Armant, 2005). Já a massa celular interna, outra categoria celular do blastocisto, dá origem ao embrião e aos folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). A interação, associação e desenvolvimento desses folhetos resultam na diferenciação dos tecidos e órgãos do feto e também na formação dos anexos embrionários (Guillomot *et al.*, 1993).

O ectoderma extraembrionário, particularmente o trofoectoderma polar, se diferencia no ectoderma coriônico e no cone ectoplacentário que, posteriormente, darão origem ao labirinto placentário e zona juncional, respectivamente (Ain *et al.*, 2006) (Figura 3).

O labirinto placentário surge a partir da interação do alantoide com o ectoderma coriônico, formação de sincícios pelas células trofoblásticas e estabelecimento da barreira materno-fetal (Watson e Cross, 2005). O ectoderma coriônico recobre a cavidade exocelômica e o alantoide se origina do tronco primitivo posterior do epiblasto dentro da cavidade exocelômica. O alantoide se desenvolve em direção ao cone ectoplacentário e se funde com o ectoderma coriônico com 8,5 dias de gestação no camundongo, período que coincide com o início dos batimentos cardíacos e da circulação no embrião (Gekas *et al.*, 2005).

A zona juncional faz fronteira com a decídua uterina mesometrial. Essa região é também referida como "trofoespôncio", "espongiotrofoblasto" e "região esponjosa". Quatro linhagens de células trofoblásticas se diferenciam a partir das células trofoblásticas progenitoras presentes na zona juncional: i) células gigantes trofoblásticas secundárias, ii)

células do espongiotrofoblasto, iii) células de glicogênio, e iv) células trofoblásticas invasoras. Todas essas células proliferam em resposta a um contato estreito com a massa celular interna, mediado pelo fator de crescimento fibroblástico 4 (FGF4) (Cross, 2000; Adamson *et al.*, 2002; Cross, 2005). Já o trofoectoderma mural, porção que não recobre a massa celular interna, dá origem às células gigantes trofoblásticas primárias (Cross *et al.*, 2002).

O sinciciotrofoblasto surge a partir da fusão das células trofoblásticas que deixam o ciclo celular e param de se dividir, ampliando e eventualmente passando por ciclos de replicação do DNA, sem a ocorrência de mitoses (endoreduplicação), para se tornarem poliploides. A diferenciação do sinciciotrofoblasto não começa até que ocorra a fixação do corioalantoide no endométrio, que será por volta de 8,5 dias de gestação. Neste período ocorre o contato do alantoide com o ectoderma coriônico que fornece um sinal para o início do processo de diferenciação (Cross, 2005).

Os eventos moleculares envolvidos na diferenciação do trofoectoderma e da massa celular interna em linhagens celulares distintas ainda não são totalmente conhecidos (Imakawa *et al.*, 2004). Postula-se que fatores de transcrição tenham um papel crítico na promoção e no direcionamento dessa primeira diferenciação. Os primeiros fatores de transcrição a serem expressos, Eomes (gene T-box Eomesodermina) e Cdx-2 (gene Cdx-2 homeobox), influenciam na diferenciação das células trofoblásticas durante o período de pré-implantação (Russ *et al.*, 2000; Imakawa *et al.*, 2004). Durante a implantação e no período pós-implantação, ocorre a expressão sequencial dos fatores de transcrição Hand1, AP-2 γ (proteína gama 2 ativada), proteína C-ets-2 (ETs-2) e Mash2, que resulta na expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9). A MMP-9 regula a invasão trofoblástica no endométrio de roedores (Imakawa *et al.*, 2004). Além disso, pesquisas já demonstraram que a baixa tensão de oxigênio direciona a diferenciação das células-tronco trofoblásticas para um fenótipo celular associado com a zona juncional (Adelman *et al.*, 2000;

Maltepe *et al.*, 2005). Este processo de desenvolvimento é dependente de vias de sinalização hipóxia dependente. Além disso, a exposição *in vitro* do citotrofoblasto primário humano a baixa tensão de oxigênio estimula a diferenciação ao longo do fenótipo de trofoblasto extraviloso (Robins *et al.*, 2007; Rosario *et al.*, 2008).

Outros fatores de transcrição, como o Oct-4 e o fator de crescimento fibroblástico 4 (FGF-4), em coordenada expressão, estão envolvidos na diferenciação e na manutenção da massa celular interna (Imakawa *et al.*, 2004). Contudo, o FGF-4 é essencial não somente para a manutenção da massa celular interna, como também para a proliferação e diferenciação do trofoectoderma (Imakawa *et al.*, 2004). O FGF-4 é importante para a manutenção do fenótipo das células tronco trofoblásticas *in vitro* (Tanaka *et al.*, 1998).

Alguns retrovírus endógenos (ERVs), genes provenientes de um retrovírus ancestral que provavelmente infectou uma célula germinativa e integra o DNA humano e de algumas espécies domésticas, também estão envolvidos no desenvolvimento e na diferenciação do trofoectoderma embrionário em humanos, roedores e ovinos (Spencer *et al.*, 2007). Ambos os genes ERVs humano, syncytin-1 e 2, codificam proteínas retrovirais altamente fusogênicas e que, possivelmente, estão envolvidas na formação do sinciciotrofoblasto (Mi *et al.*, 2000). Da mesma forma, ratas possuem dois ERVs, syncytin-A e B, que são expressos no sinciciotrofoblasto e também na fusão celular obtida *in vitro* (Dupressoir *et al.*, 2005).

O syncytin-A desempenha papel importante no desenvolvimento do sinciciotrofoblasto, uma vez que camundongos com deleção gênica para o syncytin-A morrem no útero. A morte ocorre como resultado do fracasso das células trofoblásticas de se fundirem e formar o sinciciotrofoblasto (Dupressoir *et al.*, 2009) e pelo fato do sinciciotrofoblasto ser fundamental no transporte de nutrientes para o desenvolvimento do concepto (Watson e Cross, 2005).

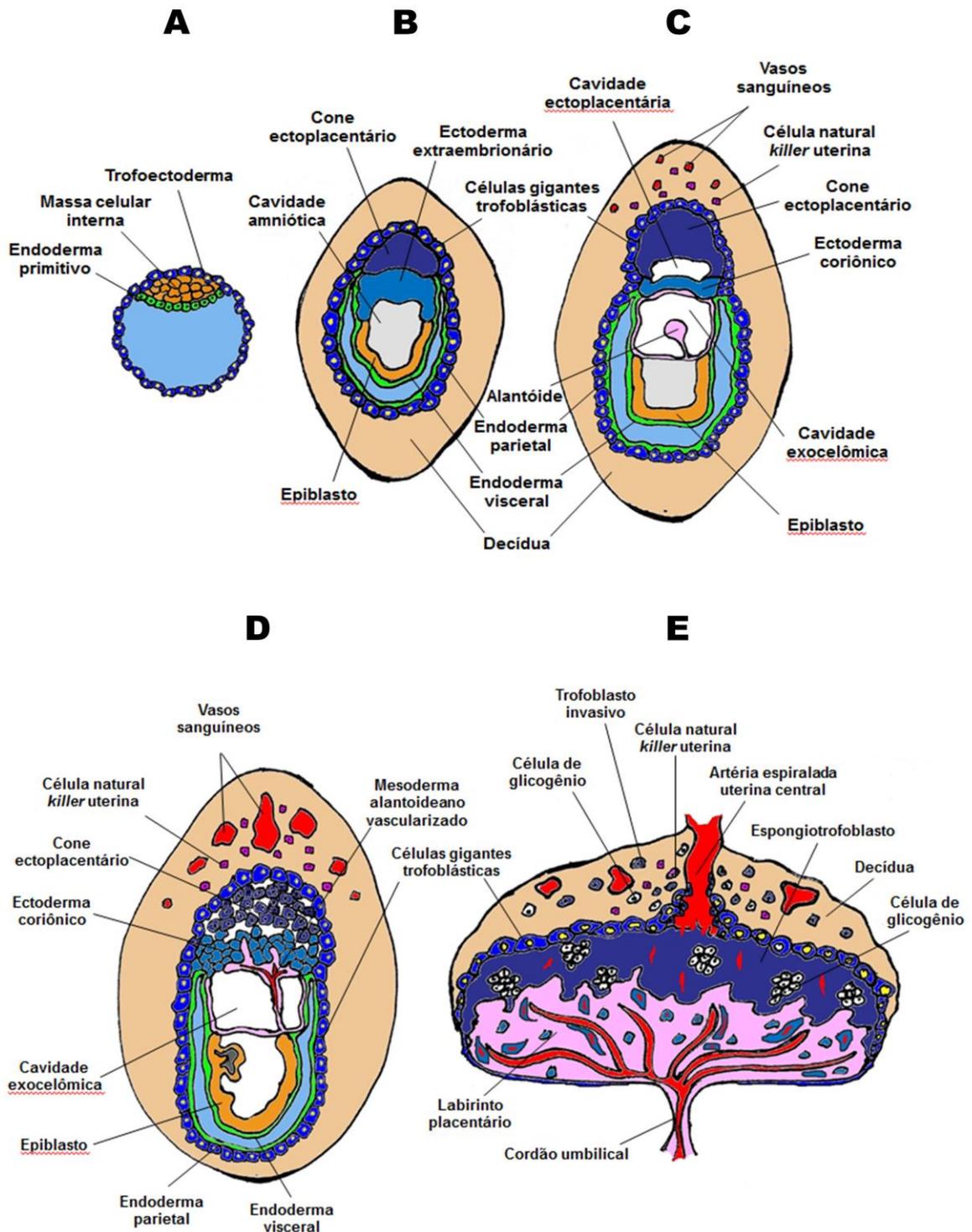


Figura 3. Desenvolvimento placentário em rata. A) Blastocisto (5,5° dg). B) Fase pós-implantação (7,5° dg). Diferenciação do trofoectoderma com formação das células gigantes ao redor do embrião e do cone ectoplacentário. C) Fase pós-implantação (8,5° dg). Formação do alantóide a partir do tronco posterior do epiblasto. D) Fase pré-placentária (10,5° dg). Formação do labirinto placentário a partir da fusão do mesoderma alantoideano com o ectoderma coriônico. E) Placenta definitiva (12° dg). Evidenciação da camada de células gigantes trofoblásticas, espongiotrofoblasto e labirinto placentário. (Juneo Freitas Silva)

3. Invasão trofoblástica e células *natural killer* uterinas (uNKs)

A invasão de trofoblastos da placenta para o tecido uterino e vasos sanguíneos maternos é um processo essencial durante a gestação de roedores e humanos e para o desenvolvimento fetal. Devido à sua notável plasticidade, os trofoblastos invasores desempenham numerosas funções como a de ancorar a placenta no tecido materno, secreção de hormônios, modulação da angiogênese/linfangiogênese decidual e remodelação das artérias espiraladas uterinas maternas. Esta última função é fundamental para aumentar o fluxo sanguíneo para a placenta e assegurar, desse modo, a transferência adequada de nutrientes e oxigênio para o feto em desenvolvimento (Knöfler, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011).

Falhas no remodelamento vascular uterino e placentário estão associadas a complicações obstétricas e neonatais importantes como a pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intra-uterino, aborto precoce, prematuridade ou até mesmo a morte materna ou fetal (Hammer, 2011; Soares *et al.*, 2012). Por isso, a pesquisa básica nesta área específica tem procurado avaliar os mecanismos moleculares que controlam a invasão do trofoblasto em condições fisiológicas e patológicas.

Ao longo dos anos, um número cada vez maior de fatores de crescimento e angiogênicos, citocinas e proteases que controlam a cinética da célula trofoblástica têm sido identificados. Esses fatores são secretados a partir de várias células tais como o próprio trofoblasto, células maternas epiteliais e do estroma, bem como as células NK e os macrófagos uterinos. Isso sugere que uma rede complexa de vários tipos celulares, mediadores e vias de sinalização regulam a invasividade da célula trofoblástica (Knöfler, 2010; Soares *et al.*, 2012).

Em geral, o trofoblasto invasivo é equipado com diferentes sistemas de proteases, o que lhe permite degradar proteínas da matriz extracelular (ECM) para promover a migração celular. Já na decídua, pelo contrário, é expressa uma variedade de proteínas inibidoras que restringem a invasão da célula trofoblástica. O trofoblasto invasivo expressa diferentes membros da família

das metaloproteinasas de matriz (MMPs), catepsinas e ativador uroquinase do plasminogênio (uPA) (Lala e Chakraborty, 2003; Varanou *et al.*, 2006). No entanto, as células deciduais produzem inibidores teciduais das metaloproteinasas (TIMPs) e o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI) (Schatz e Lockwood, 1993). No entanto, outros fatores produzidos na interface materno-fetal também podem inibir a migração trofoblástica como o interferon gama (INF γ), a interleucina 10 (IL-10), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e o fator de crescimento transformante beta (TGF β) (Hu *et al.*, 2006).

As células uNKs são as principais células do sistema imunológico materno presentes no endométrio decidualizado antes e durante o estabelecimento da placenta em espécies com placentação hemocorial (humanos, ratos e camundongos). As células uNKs são integrantes da linhagem linfóide e, semelhante aos linfócitos T e B, podem ser divididas em várias subpopulações. As células NKs presentes no útero são fenotipicamente e funcionalmente diferentes daquelas presentes na circulação sistêmica (Soares *et al.*, 2012). Sua função exata na gestação ainda é desconhecida, mas acredita-se que elas estejam envolvidas na regulação do processo de placentação. Contudo, pesquisas já mostram que elas, junto com as células trofoblásticas, coordenam o remodelamento das artérias espiraladas uterinas (Malassine *et al.*, 2003). Camundongos que não possuem uNKs são férteis, mas exibem remodelamento vascular uterino inadequado, pobre decidualização e baixo peso fetal, destacando a importância das células uNKs na placentação (Colucci *et al.*, 2011). Elas cumprem essa função pela secreção de uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento como VEGF, INF γ , óxido nítrico (NO), interleucina 15 (IL-15), entre outros (Rosario *et al.*, 2008; Hammer, 2011; Soares *et al.*, 2012). Contudo, a participação das uNKs no remodelamento vascular uterino é somente nos estágios iniciais da gestação, uma vez que o remodelamento vascular uterino se torna mais proeminente nas etapas finais da gestação, quando as uNKs estão ausentes (Soares *et al.*, 2012).

4. Endocrinologia placentária

Os hormônios placentários são necessários para o estabelecimento e manutenção da gestação, adaptação do organismo materno à gestação e para o desenvolvimento fetal. A placenta humana e das espécies domésticas é fonte de uma ampla variedade de hormônios, particularmente progesterona e estrógeno. Entre os estrógenos encontram-se o estriol (E3) e uma quantidade significativa de 17 β -estradiol (E2) e de estrona (E1) (Rama *et al.*, 2004). Contudo, dependendo da espécie, outros hormônios também são produzidos pela placenta como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), a gonadotrofina coriônica equina (eCG), o lactogênio placentário (PL), a leptina placentária e a família dos hormônios relacionados a prolactina (PRL) (Gambino *et al.*, 2012).

4.1. Estrógeno, progesterona e leptina placentária

Durante a gestação, a progesterona e o E2 apresentam funções importantes na manutenção do útero em um estado de repouso, para assegurar o desenvolvimento normal da gestação. A este respeito, a progesterona promove o crescimento uterino e suprime a contratilidade miometrial, enquanto os estrógenos regulam a implantação e a placentação (Malassiné e Cronier, 2002). Semelhante a outros órgãos esteroidogênicos, a placenta humana não expressa citocromo P450 17 α -hidroxilase. Desse modo, ela é incapaz de utilizar os esteroides, tais como a pregnenolona e a progesterona, como substrato para a síntese de estrógeno. Assim, a síntese de estrógeno pela placenta depende de uma fonte precursora de andrógeno (dehidroepiandrosterona [DHEA] e sulfato de dehidroepiandrosterona [DHEA-S]) produzida pela adrenal materna (50%) e pela adrenal fetal (50%). A DHEA e o DHEA-S difundem-se a partir do sangue fetal em direção ao sinciotrofoblasto, são hidrolisados por uma sulfatase esteroide, e em seguida são aromatizados no sinciotrofoblasto pela citocromo P450 aromatase para formar estrógeno (Malassiné e Cronier, 2002; Gambino *et al.*, 2012).

A participação do E2 e da progesterona é crítica para a regulação dos eventos cíclicos de

decidualização no endométrio humano e de roedores. A proliferação intensa das células epiteliais e do estroma ocorre em resposta a níveis crescentes de E2 durante a fase proliferativa endometrial. Já o evento de diferenciação durante a decidualização começa no final da fase secretora do endométrio, onde as células estromais se transformam em células deciduais e adquirem propriedades bioquímicas e celulares únicas que lhes permitem suportar a implantação do embrião (Gambino *et al.*, 2012).

Os estrógenos também desempenham função central na regulação do desenvolvimento e na diferenciação bioquímica, fisiológica e morfológica das células trofoblásticas (Cronier *et al.*, 1999). Pesquisas têm demonstrado que o E2 estimula a diferenciação morfológica do citotrofoblasto e das células BeWo de coriocarcinoma humano em sinciotrofoblastos. Além disso, a indução da diferenciação trofoblástica estimulada pelo estrógeno pode ser mediada pela atividade do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF β -1) (Yashwanth *et al.*, 2006). Esta diferenciação é acompanhada por perda paralela da expressão de ciclinas A2 e E, e por aumento da regulação do p27 inibidor de Cdk, eventos que estão integralmente relacionados com a inibição da proliferação do trofoblasto humano (Rama *et al.*, 2004; Gambino *et al.*, 2012).

O estrógeno na interface materno-fetal também regula a invasão e o remodelamento das artérias espiraladas uterinas pelo trofoblasto extraviloso durante a gestação. Além disso, verificou-se que o estrógeno estimula o crescimento de vasos sanguíneos na placenta de primatas no início da gestação por meio do aumento da expressão de VEGF pelo citotrofoblasto (Gambino *et al.*, 2012).

Pesquisas demonstraram que o estradiol é capaz de modular a liberação do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) em explantes de vilosidades coriônicas de modo dose-dependente. Estes achados sugerem que o aumento dos níveis de estrógeno com o avançar da gestação pode ter papel importante na regulação da secreção de MIF na interface materno-fetal (Ietta *et al.*, 2010; Gambino *et al.*, 2012). O MIF é um modulador chave das respostas inflamatórias e imunes, além de regular a geração de metaloproteinases de matriz, produtos do ácido araquidônico, indução

de óxido nítrico e produção de citocinas pelas células T (Ietta *et al.*, 2010).

O estrógeno também age na célula trofoblástica controlando sua produção hormonal. Ele controla a síntese de progesterona (Rama *et al.*, 2004), de hCG e de PL (Cronier *et al.*, 1999) pelo trofoblasto, enquanto a produção do hormônio liberador de corticotrofina é negativamente influenciado pelo estrógeno (Ni *et al.*, 2002). Além disso, o estrógeno pode regular de forma dose-dependente a expressão de leptina placentária (Henson e Castracane, 2006; Gambino *et al.*, 2012).

A síntese e a secreção de leptina pelas células trofoblásticas, como também dos seus receptores, têm sido amplamente estudados (Masuzaki *et al.*, 1997; Senaris *et al.*, 1997), sugerindo que ela pode atuar de forma autócrina e/ou parácrina através de receptores presentes no trofoblasto e na decídua (Henson *et al.*, 1998; Miko *et al.*, 2011).

Acredita-se que a leptina placentária seja um hormônio chave durante a gestação e vários estudos têm mostrado que ela induz a proliferação das células trofoblásticas, inibe a apoptose e estimula a síntese de proteínas, hormônios e citocinas pelas células trofoblásticas (Gambino *et al.*, 2010; Gambino *et al.*, 2012). A leptina placentária também aumenta a expressão das MMPs 2 e 9, influencia a atividade angiogênica ao inibir a expressão de VEGF e influencia a atividade imunomodulatória na interface materno-fetal. Além disso, regula o crescimento e o desenvolvimento fetal, particularmente o processo de condrogênese e osteogênese (Gambino *et al.*, 2010; Gambino *et al.*, 2012). Alteração no metabolismo da leptina ou na função da placenta tem sido implicada na patogênese de diversas patologias gestacionais como o aborto recorrente, diabetes gestacional, retardo do crescimento intra-uterino e pré-eclâmpsia (Bajoria *et al.*, 2002; Sagawa *et al.*, 2002; Gambino *et al.*, 2012). Outras funções da leptina placentária na reprodução seriam sua influência na função ovariana, na maturação de oócitos e na implantação embrionária (Miko *et al.*, 2011; Gambino *et al.*, 2012). Em contrapartida, várias condições fisiológicas e/ou fatores, hormônios e citocinas também regulam a expressão de leptina placentária como a insulina, hipóxia, glicocorticoides, interleucina 1 α (IL-

1 α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), IFN γ , PL, hCG, adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e progesterona (Gambino *et al.*, 2012).

A progesterona é um dos fatores que controlam a invasividade da célula trofoblástica pela redução da secreção de gelatinase, MMP-2 e MMP-9 pelo trofoblasto, embora este efeito seja dependente do período gestacional (Shimonovitz *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2004; Miko *et al.*, 2011).

O fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), identificado em humanos e camundongos, foi inicialmente descrito como uma molécula induzida pela progesterona para mediar os efeitos dela durante a gestação (Szekeres-Bartho *et al.*, 1985). Contudo, recentemente, também tem sido identificada em células tumorais com alto índice mitótico (Srivastava *et al.*, 2007). A distribuição de PIBF dentro da decídua durante o primeiro trimestre de gestação em humanos coincide com os locais de invasão trofoblástica, com forte imunomarcagem de PIBF no trofoblasto extraviloso (Anderle *et al.*, 2008). Além disso, já foi constatado que o PIBF reduz a expressão de leptina placentária e de seu receptor, mostrando outra via pela qual a progesterona também afeta a invasão trofoblástica (Miko *et al.*, 2011).

A progesterona também apresenta atividade imunomodulatória na interface materno-fetal, uma vez que Miller *et al.* (1996) observaram que macrófagos de camundongos sob efeito de altas doses de progesterona apresentam redução da expressão de iNOS e TNF α , citocinas anti e pró-inflamatórias durante a gestação, respectivamente.

4.2. Hormônios relacionados à prolactina (PRL)

A prolactina (PRL) foi originalmente identificada como um hormônio da parte distal da adenohipófise envolvida no desenvolvimento da glândula mamária (Riddle *et al.*, 1933). Contudo, pesquisas já mostraram que a PRL apresenta uma grande variedade de ações biológicas e de células-alvo (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2008). A PRL é de particular importância para o sistema genital da

fêmea. Camundongos *knockout* para a síntese de PRL ou do seu receptor apresentam déficit na produção de estrógeno e de progesterona, falhas na decidualização e alterações no comportamento materno (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2008).

A placenta dos mamíferos é uma fonte de atividade lactogênica extra-hipofisária através da produção de vários hormônios lactogênicos estruturalmente relacionados à PRL (Toft e Linzer, 2000; Simmons *et al.*, 2008). Alguns desses hormônios, como o lactogênio placentário 1 (PL-1) e o proliferin (Plf), são expressos no início da gestação, principalmente pelas células gigantes trofoblásticas. Já o lactogênio placentário 2 (PL-2), que é sintetizado somente pelas células gigantes trofoblásticas, é produzido durante a segunda metade da gestação. A proteína relacionada ao proliferin (rPlf) é expressa pelas células gigantes e espongiotrofoblastos, enquanto que a proteína decidual/trofoblástica relacionada à prolactina (d/tPRP) é produzida a partir dos trofoblastos invasivos na decídua. As funções biológicas e os receptores desses hormônios têm sido estudados, mas ainda pouco se sabe sobre a ação deles no tecido placentário como também no organismo materno e fetal (Toft e Linzer, 2000).

Entre os hormônios com bioatividade conhecida, os PL 1 e 2, que se ligam ao receptor para PRL, apresentam ações semelhantes ao da prolactina adeno-hipofisária como a indução da produção de progesterona pelo corpo lúteo (Toft e Linzer, 2000). Além disso, eles influenciam no desenvolvimento da glândula mamária, no comportamento materno (Mann e Bridges, 2001) e na função pancreática (Sorenson e Brelje, 1997). Os PLs também estimulam a expressão gênica do receptor para estrógeno (ER) (Telleria *et al.*, 1998).

Já o proliferin (Plf) e a proteína relacionada ao proliferin (rPlf) são importantes moduladores angiogênicos e anti-angiogênicos, respectivamente, no desenvolvimento dos vasos sanguíneos durante a gestação. O Plf apresenta maior atividade angiogênica no terço médio da gestação, sendo que a redução na produção placentária de Plf resulta em diminuição da vascularização decidual. Por outro lado, a rPlf apresenta maior ação biológica na segunda metade da gestação (Toft e Linzer, 2000;

Corbacho *et al.*, 2002). É interessante ressaltar que, além das suas ações biológicas sobre a placenta, o Plf pode ter funções específicas durante o desenvolvimento fetal. Diferente da rPlf, o Plf pode ser transportado através das membranas extra-embriônicas da placenta para o fluido amniótico, onde entra em contato direto com o feto em desenvolvimento. O Plf apresenta receptores no coração e nos vasos sanguíneos do feto. Por causa disso, embora os efeitos fisiológicos do Plf no feto não sejam ainda conhecidos, sugere-se que ele possa estimular a migração de células endoteliais promovendo a angiogênese durante o desenvolvimento dos tecidos fetais (Corbacho *et al.*, 2002).

Outros hormônios semelhantes à PRL como a proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) tem a capacidade de se ligar às células uNKs inibindo sua atividade citolítica. Já a PLP-E e a PLP-F se ligam aos megacariócitos da medula óssea e do baço. A diferenciação dos megacariócitos é estimulada pela PLP-E (Toft e Linzer, 2000).

5. Imunologia placentária

A definição da gestação como um estado T-helper 2 (Th-2) postula que a gestação é uma condição anti-inflamatória, e uma mudança para um estado 'Th-1' levaria a complicações gestacionais como o aborto. Contudo, já há pesquisas demonstrando que o perfil imunológico na interface materno-fetal depende do período gestacional (Wegmann e Guilbert, 1992; Chaouat *et al.*, 1997; Koga *et al.*, 2009).

O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias Th-1, tais como IFN γ , interleucina 2 (IL-2) e TNF α , e as citocinas anti-inflamatórias Th-2, tais como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), iNOS e TGF, é uma condição essencial para o sucesso da gestação (Toder *et al.*, 2003). As citocinas pró-inflamatórias são necessárias nos estágios iniciais da placentação, mas pouco depois, a mudança de Th-1 para Th-2 é essencial para evitar problemas gestacionais (Coulam, 2000).

Na mulher, o início da gestação é caracterizado por um perfil pró-inflamatório dominante, com elevados níveis de citocinas e quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8) e a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1). Os níveis circulantes de

todas essas citocinas diminuem significativamente durante o terço médio da gestação, mas aumentam novamente no final. É importante ressaltar que todas essas alterações podem estar associadas com alterações locais no sítio de implantação, podendo não representar um perfil sistêmico (Koga *et al.*, 2009).

Durante a fase inicial de implantação, as células trofoblásticas precisam romper o revestimento epitelial do endométrio no intuito de aderir e invadir a lâmina própria, bem como substituir o músculo liso vascular das artérias espiraladas uterinas a fim de assegurar um fornecimento adequado de sangue (Koga *et al.*, 2009). Por isso, o início da gestação é uma fase pró-inflamatória (Koga e Mor, 2007; Koga *et al.*, 2009).

A segunda fase imunológica da gestação é caracterizada por um rápido crescimento e desenvolvimento fetal. A mãe e o feto são simbióticos, de modo que a característica imunológica predominante na placenta é a indução de um estado anti-inflamatório (Koga e Mor, 2007; Koga *et al.*, 2009).

Já no final da gestação, quando o feto já completou seu desenvolvimento, ocorrerá o parto. O parto, resultante do aumento do cortisol fetal e estrógeno materno, redução da progesterona e liberação de ocitocina e PGF2 α pela mãe, é caracterizado por um influxo de células do sistema imunológico no miométrio, com o objetivo de promover o desenvolvimento de um processo inflamatório. Este ambiente pró-inflamatório promove a contração do útero, a expulsão do feto e a rejeição da placenta. Assim, a gestação é uma condição pró- e anti-inflamatória, dependendo do período (Jainudeen e Hafez, 1982; Koga e Mor, 2007; Koga *et al.*, 2009).

No início da gestação, várias células do sistema imunológico infiltram-se na decídua e acumulam-se ao redor das células trofoblásticas invasoras, particularmente as células uNKs. Toda essa interação desempenha papel crítico na regulação imune da interface materno-fetal e no sucesso da gestação (Koga *et al.*, 2009). Estudos clínicos têm demonstrado forte associação entre complicações gestacionais e infecções intra-uterinas, sendo que elas são responsáveis por 40% dos casos de parto prematuro. Além disso, outras patologias gestacionais, como pré-

eclâmpsia, podem apresentar uma doença infecciosa como causa (von Dadelszen e Magee, 2002; Koga *et al.*, 2009).

No entanto, o trofoblasto, semelhante a uma célula do sistema imune inato, também expressa receptores que reconhecem antígenos estranhos ao organismo materno. Através destes receptores, também chamados de receptores de reconhecimento padrão (PRR), a célula trofoblástica é capaz de reconhecer a presença de bactérias, vírus, células que morrem e tecidos danificados. Após o reconhecimento, o trofoblasto secreta um conjunto específico de citocinas. Estas citocinas vão atuar sobre as células do sistema imunológico presentes na decídua coordenando-as a trabalhar em conjunto, a favor do feto em crescimento (Takeda e Akira, 2001; Gordon, 2002). Contudo, uma infecção viral ou bacteriana pode afetar o equilíbrio dessas interações. Há diferentes tipos de PRRs, sendo a principal família representada pelos receptores *toll-like* (TLR) (Koga *et al.*, 2009).

5.1. Receptores *toll-like* (TLRs)

Os TLRs são proteínas transmembrana com domínios extracelulares ricos em leucina. Eles são evolutivamente conservados com o intuito de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que estão presentes na superfície de bactérias, vírus, fungos e parasitas. Onze TLRs de mamíferos já foram identificados (TLR-1 a TLR-11), embora nenhuma função para o TLR-11 ainda tenha sido identificada em humanos (Takeda e Akira, 2001; Gordon, 2002; Koga *et al.*, 2009).

Cada TLR difere na sua especificidade, de modo que a família dos TLRs pode responder a uma grande variedade de PAMPs presentes em agentes infecciosos. O TLR4, o primeiro a ser identificado, é específico para o lipopolissacarídeo (LPS) presente na superfície de bactérias gram-negativas. Já o TLR2 apresenta menor especificidade, reconhecendo lipoproteínas de bactérias gram-positivas como o peptídeoglicano (PGN) e o ácido lipoteicoico (LTA), além do zimosan presente na superfície de fungos. Os TLRs 3, 7 e 8 desempenham papel importante na resposta a vírus. O TLR3 é conhecido por se ligar ao RNA viral de fita dupla, enquanto os TLRs 7 e 8 interagem com o

RNA de fita simples. O TLR5 reconhece a flagelina bacteriana e o TLR9 medeia respostas celulares ao DNA bacteriano, embora possa ser também ativado pelo Herpes vírus. Contudo, além de reconhecer PAMPs, os TLRs 2 e 4 podem se ligar a moléculas endógenas chamadas de DAMPs (padrões moleculares associados a perigo). Entre elas estão as espécies reativas de oxigênio (ROS), o grupo de proteínas de alta mobilidade do tipo 1 (HMGB1) e as proteínas de choque térmico (Hsp), tais como a Hsp60, Hsp70 e Hsp90 (Holmlund *et al.*, 2002; Abrahams *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2009).

A ligação dos TLRs geralmente resulta na produção de citocinas e fatores anti-microbianos por meio de uma via comum de sinalização intracelular. Após o reconhecimento, o TLR recruta a proteína adaptadora da sinalização intracelular, fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), e uma cascata de quinases que desencadeiam a ativação subsequente da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), resultando na geração da resposta inflamatória. No entanto, o TLR3 e o TLR4 também podem ativar a resposta inflamatória por uma via independente do MyD88. Essa sinalização ocorre através de uma proteína adaptadora contendo um domínio Tir induzido pelo interferon beta (TRIF) que pode ativar não somente a via do NFkB, como também a fosforilação do fator regulatório 3 do interferon (IRF-3). Essa via alternativa gera uma resposta antiviral associada com a produção de interferons (Akira e Hoshino, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003).

5.2. Expressão de receptores toll-like e citocinas pró- e anti-inflamatórias na placenta

A expressão de todos os TLRs já foi descrita na placenta humana e de roedores, sendo o trofoblasto a principal célula que expressa esses receptores. No entanto, o padrão de expressão dos TLRs pela célula trofoblástica varia de acordo com a idade gestacional, bem como com a fase de diferenciação do trofoblasto (Koga *et al.*, 2009).

A expressão de TLRs em trofoblastos no início da gestação gera padrões distintos de resposta, sendo esta resposta dependente do tipo de estímulo e, portanto, do TLR que é ativado.

Assim, após a ligação do TLR4 com LPS, as células trofoblásticas geram uma resposta inflamatória lenta caracterizada por uma moderada expressão e liberação de citocinas como TNF α , IL-6 e IL-1 pela placenta, além de aumentar a concentração de TNF α e IL-6 no soro materno. Em contraste, o peptídeoglicano, que sinaliza através do TLR2, induz as células trofoblásticas a sofrer apoptose. Outro estudo que descreve a indução de apoptose em trofoblasto através da ativação de TLR2 inclui o citomegalovírus humano inativado por ultravioleta (HCMV). Todos esses estudos sugerem que as células trofoblásticas são capazes de reconhecer os produtos bacterianos ou virais através dos TLRs e induzir diferentes respostas. Desse modo, dependendo do tipo de resposta imunológica, complicações gestacionais podem ocorrer como parto prematuro, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intra-uterino e aborto (Abrahams *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2007) demonstraram que o tratamento de ratas com poli(I:C), um composto que mimetiza a infecção viral, prejudicou o remodelamento vascular uterino com perda fetal através do aumento de expressão de TNF α .

De forma interessante, um novo aspecto a respeito das funções dos TLRs está relacionado à sua capacidade de reconhecer não apenas ligantes de origem microbiana, como também antígenos do próprio organismo, chamados de "sinais de perigo" (Matzinger, 2002). Eles são liberados por células lesadas (Matzinger, 2002). Isto sugere que os TLRs podem estar envolvidos não somente com processos infecciosos, mas também com condições não infecciosas que estão associadas à gestação (Koga *et al.*, 2009). Recentemente, Holmlund *et al.* (2007) demonstraram que HMGB1, um ligante do TLR4, é altamente expresso na decídua de mulheres com pré-eclâmpsia.

5.3. Fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na placenta

O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é um regulador crucial da imunidade inata e adaptativa afetando a resposta e o comportamento de macrófagos e de linfócitos em processos fisiológicos e patológicos. Importantes papéis para o MIF já foram documentados na

ovulação, ciclo estral e menstrual e no início da gestação, tanto no endométrio quanto na placenta. O MIF também está implicado em outros processos celulares fundamentais, como a angiogênese e a proliferação celular (Viganò *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012).

O MIF foi originalmente identificado como um fator liberado por linfócitos T ativados capaz de inibir a migração aleatória de macrófagos *in vitro* (Bloom e Bennett, 1966). Embora os macrófagos e os linfócitos T sejam as principais fontes de MIF, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais também são capazes de expressá-lo e liberá-lo. No entanto, o MIF é também expresso em células trofoblásticas e membranas fetais, além de ser detectado no líquido amniótico e no soro materno e fetal (Cardaropoli *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, o foco principal das pesquisas sobre o MIF tem sido o seu papel como mediador pró-inflamatório. Tem sido demonstrado que o MIF, direta ou indiretamente pelo seu receptor CD74, promove a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF α , INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, NO, além de metaloproteinases de matriz (MMPs) e cicloxigenase-2 (COX-2) (Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Em contrapartida, o TNF α e o INF γ também induzem a expressão de MIF por macrófagos por meio da ativação de TLRs (Calandra *et al.*, 1995; Todros *et al.*, 2005). Os níveis séricos de MIF estão aumentados em mulheres com pré-eclâmpsia (Todros *et al.*, 2005). Vale ressaltar que os níveis proteicos e de mRNA de MIF são maiores durante os estágios iniciais da gestação, pelo menos na mulher, com declínio no final do primeiro trimestre (Cardaropoli *et al.*, 2012).

A neutralização do MIF com o uso de anticorpos aumenta a atividade citolítica das células uNKs, o que sugere um papel imunomodulatório para essa citocina na interface materno-fetal (Arcuri *et al.*, 2006). Além disso, baixa tensão de oxigênio *in vitro* aumenta a expressão proteica e de mRNA de MIF em explantes de vilosidades coriônicas (Ietta *et al.*, 2007). Uma das ações mais conhecidas para o MIF é a sua capacidade em promover a proliferação celular e suprimir a apoptose (Cardaropoli *et al.*, 2012). Estudos também tem mostrado que o MIF tem papel central na indução da angiogênese por agir como

quimiotático para células endoteliais vasculares humanas (Amin *et al.*, 2003). Hormônios também podem influenciar a ação do MIF, uma vez que já foi demonstrada correlação significativa positiva entre os níveis proteicos de MIF e os receptores para progesterona e estrógeno (Verjans *et al.*, 2009). A progesterona também aumenta a produção de MIF no cólon de ratas com colite experimental (Houdeau *et al.*, 2007).

6. Angiogênese placentária

A angiogênese placentária é de fundamental importância para garantir o fluxo de sangue adequado para a placenta e, com isso, fornecer os substratos que dão suporte ao crescimento e ao desenvolvimento fetal (Reynolds *et al.*, 2010). Portanto, não é surpreendente que as condições que afetam o crescimento fetal, como o genótipo materno e fetal, aumento do número de fetos, excesso ou privação de nutrientes, estresse ambiental ou desordens metabólicas, como os distúrbios endócrinos, possam estar associados à hipóxia fetal e/ou absorção reduzida de nutrientes, bem como alteração da angiogênese placentária e redução do fluxo sanguíneo (Vonnahme *et al.*, 2001; Vonnahme *et al.*, 2002; Anthony *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2010). Sendo assim, o crescimento e o desenvolvimento dos leitos vasculares são considerados críticos para o crescimento e para a função útero-placentária (Reynolds *et al.*, 2010).

A placenta dos mamíferos sofre rápida angiogênese (Reynolds *et al.*, 2006). Para que a gestação seja bem sucedida é necessário o remodelamento do endométrio para coordenar a implantação, a angiogênese e o remodelamento vascular na interface materno-fetal. Tudo isso é importante para fornecer o suporte hematotrófico adequado para o desenvolvimento do concepto (Charnock-Jones *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004). Por conseguinte, é possível que a interrupção desses eventos iniciais vasculares possa contribuir para a fisiopatologia de doenças como o aborto espontâneo, a pré-eclâmpsia ou o retardo do crescimento intra-uterino (Torry *et al.*, 2004).

Uma das adaptações locais mais importantes durante a gestação é a mudança do fluxo

sanguíneo materno para o local da implantação (Cross *et al.*, 2002). Em roedores, primatas não humanos e humanos, que apresentam placenta hemocorial, o sangue materno entra no útero pelas artérias radiais que se ramificam em artérias espiraladas. As artérias espiraladas tornam-se dilatadas na decídua e, a partir desse ponto, perdem progressivamente elastina e músculo liso. A perda de músculo nas artérias deciduais promove vasodilatação e, conseqüentemente, aumento do fluxo sanguíneo. Em seguida, elas convergem em direção ao sinciotrofoblasto e, nesse ponto, perdem seu revestimento endotelial para que o leito vascular seja revestido por células trofoblásticas. Do interior do sinciotrofoblasto, o sangue é transportado por canais arteriais, em número de um a quatro, que passam diretamente para a base da placenta. Depois de passar pelos canais arteriais e ocorrer as trocas hematotróficas, o sangue materno retorna para o lado materno da placenta, por meio de seios sanguíneos tortuosos alinhados por células trofoblásticas e que se anastomosam no labirinto. Os seios sanguíneos coalescem em canais maiores que atravessam o espongiotrofoblasto e o sinciotrofoblasto. A partir daí, voltam a ser revestidos por células endoteliais e dão origem a grandes seios venosos na decídua basal. Já o sangue fetal atravessa o labirinto em direção oposta à do sangue materno, construindo um ambiente de contra-corrente, maximizando o fornecimento de oxigênio ao sangue venoso umbilical do feto (Cross *et al.*, 2002).

Todo o processo de remodelamento vascular uterino é regulado pela interação de vários subtipos de células trofoblásticas com células endoteliais e do sistema imunológico (Hu e Cross, 2010). Em roedores, duas linhagens trofoblásticas infiltram-se na decídua uterina: os trofoblastos endovasculares e os trofoblastos intersticiais. Os trofoblastos endovasculares, que representam um tipo especializado de célula gigante trofoblástica, infiltram na decídua a partir do 10º dia de gestação, associado à parede das artérias (Cross *et al.*, 2002). O mesmo tipo celular pode ser comparado ao trofoblasto extraviloso humano, que se infiltra nas artérias espiraladas e desestabiliza o músculo liso vascular (Reynolds *et al.*, 2010). Já as células trofoblásticas intersticiais, que invadem a decídua, não expressam marcadores de células gigantes trofoblásticas (Plf e Hand-1). Elas

apresentam morfologia característica das células de glicogênio e não entram no lúmen das artérias espiraladas. A função delas ainda é desconhecida e sua localização se restringe apenas ao interstício e ao redor dos vasos deciduais (Cross *et al.*, 2002). Essas duas vias de invasão, intersticial e endovascular, sofrem influência de fatores maternos. A invasão intersticial aumenta quando ocorre aumento do teor de oxigênio e redução da proliferação celular na placenta. Já a via endovascular é influenciada pela apoptose dos trofoblastos perivascular e intramurais, que é induzida por macrófagos deciduais. Ambos os eventos limitam o número e o grau de adaptação das artérias espiraladas com a finalidade de atender às necessidades do feto em crescimento (Huppertz *et al.*, 2006).

Durante a gestação, a perda de músculo liso das artérias espiraladas de camundongos não tem sido associada com a invasão trofoblástica como é observado em humanos, mas tem sido associada à ação das células uNKs (Guimond *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 2000). Camundongos mutantes, sem células uNKs, apresentam artérias espiraladas anormais, com diâmetro vascular menor que o normal e persistência das camadas de músculo liso. Esses animais apresentam redução da fertilidade, sem, no entanto, serem inférteis (Guimond *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 2000). Curiosamente, uma invasão trofoblástica decidual mais extensa foi observada em ratas deficientes em células uNKs, sugerindo que as células trofoblásticas podem tentar compensar o comprometimento da vascularização decorrente da ausência das uNKs (Cross *et al.*, 2002). Em humanos, as células NKs também estão presentes no útero. Acredita-se que elas possam mediar a dilatação das artérias deciduais que ocorre no início da gestação na ausência de interações celulares com o trofoblasto extraviloso (Craven *et al.*, 1998).

Três das patologias mais comuns na gestação de humanos, representadas pelo retardo do crescimento intra-uterino, aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, parecem estar associadas com alterações no desenvolvimento vascular da placenta. Essas alterações podem ser o reflexo do descontrole gênico de fatores angiogênicos, uma vez que várias dessas patologias estão ligadas a falhas na expressão do VEGF. As pesquisas destacam que o defeito de um único gene pode ser suficiente para impedir o desenvolvimento

vascular normal da placenta e, assim, comprometer a gestação (Redmer *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008).

Há também um grande número de fatores de crescimento potencialmente importantes que regulam, direta ou indiretamente, a angiogênese na interface materno-fetal. Devido à importância da angiogênese placentária durante a implantação e placentação, aumentam os anseios para se determinar a expressão, regulação e função dos fatores angiogênicos na placenta durante a gestação (Torry *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2006; Vonnahme *et al.*, 2008). A compreensão destes fatores é fundamental para identificar os caminhos-alvo para a intervenção terapêutica no intuito de prevenir complicações e aumentar o sucesso da gestação (Hirashima *et al.*, 2003).

6.1. Fatores angiogênicos placentários

Os fatores produzidos pelas células gigantes trofoblásticas, que fazem com que o revestimento endotelial dos vasos sanguíneos seja substituído por células trofoblásticas, são desconhecidos (Cross *et al.*, 2002). Mas acredita-se que uma matriz complexa de agentes pró-angiogênicos, anti-angiogênicos e vasoativos seja produzida pelas células gigantes trofoblásticas e/ou por outras células trofoblásticas ou decíduais (Cross *et al.*, 2002; Borowicz *et al.*, 2007; Douglas *et al.*, 2009).

O VEGF é o principal fator angiogênico expresso pelas células gigantes trofoblásticas (Voss *et al.*, 2000). Contudo, na ausência de uma sinalização concomitante da angiopoetina 1, o VEGF produz novos vasos, mas sem estabilidade da sua estrutura, com subsequente aumento da permeabilidade vascular (Yancopoulos *et al.*, 2000). Ratas mutantes, que apresentam deleção gênica para os receptores do VEGF (Flt-1 e/ou Flk-1), apresentam defeitos na vasculogênese e na angiogênese feto-placentária, resultando em morte embrionária (Cross *et al.*, 2002). O Flk-1 é reconhecido como o principal receptor angiogênico para o VEGF, enquanto o Flt-1 desempenha papel secundário na placenta, onde apresenta menor expressão e atua na ausência do Flk-1 (Maynard *et al.*, 2003).

O PGF atua juntamente com o VEGF no desenvolvimento vascular da placenta (Vuorela *et al.*, 1997; Smith, 2000; Plaisier *et al.*, 2007). Ele tem as mesmas ações bioquímicas e funcionais do VEGF, mas só atua através do Flt-1. O PGF e o VEGF têm efeitos sinérgicos sobre a angiogênese, mas os vasos formados pela ação do PGF são mais estáveis do que os induzidos pelo VEGF (Carmeliet *et al.*, 2001). O PGF é amplamente expresso na placenta humana podendo ser um importante regulador parácrino da angiogênese decidual e um mediador autócrino da função trofoblástica (Sherer e Abulafia, 2001; Plaisier *et al.*, 2007). Em humanos, a expressão de VEGF e de Flk-1 é mais intensa no início da gestação e diminui com o avançar dela (Jackson *et al.*, 1994), enquanto a expressão de PGF e de Flt-1 aumenta no decorrer da gestação (Clark *et al.*, 1996).

O fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) é outro fator angiogênico que estimula a proliferação das células endoteliais feto-placentárias e uterinas. Tanto o VEGF quanto o FGFb regulam o fluxo sanguíneo útero-placentário à medida que estimulam a produção de NO pelas células endoteliais que, por sua vez, também estimula a expressão de VEGF e FGFb (Plaisier *et al.*, 2009). O NO, que também é expresso pelas células trofoblásticas, causa relaxamento da musculatura lisa vascular e, conseqüentemente, aumento do fluxo sanguíneo para a interface materno-fetal (Cross *et al.*, 2002). Além do NO, as células gigantes trofoblásticas também expressam outras substâncias vasoativas como a adrenomedulina (ADM) que é um vasodilatador potente expresso no início de gestação (Montuenga *et al.*, 1997; Yotsumoto *et al.*, 1998).

As angiopoetinas também regulam o crescimento e o desenvolvimento vascular útero-placentário pela sinalização do seu receptor, Tie2. Camundongos com deleção gênica para angiopoetina-1 (Ang-1) apresentam defeitos cardiovasculares e morrem no terço médio da gestação. A Ang-1 não estimula a proliferação das células endoteliais, mas afeta a organização microvascular, a estabilidade e a sobrevivência das células endoteliais necessárias para o remodelamento vascular. Já Ang-2 é um antagonista funcional da Ang-1, levando ao enfraquecimento das interações celulares e permitindo o acesso de indutores angiogênicos,

como o VEGF (Geva e Jaffe, 2000). Não tem sido observada relação das angiopoetinas com o aborto, mas a expressão endotelial reduzida de Tie2 tem sido associada à ocorrência de aborto (Vuorela *et al.*, 2000).

Com relação ao controle da expressão gênica desses fatores angiogênicos, acredita-se que o estrógeno seja um fator chave nesse controle. Em ratas e ovelhas ovariectomizadas, a expressão endometrial de VEGF, FGFb, Ang-1 e Ang-2 aumenta dentro de algumas horas após o tratamento com estrógeno, com subsequente aumento da vascularização e do fluxo sanguíneo uterino (Reynolds e Redmer, 1998; Johnson *et al.*, 2006; Aberdeen *et al.*, 2008). Mas não está claro até que ponto o estrógeno e a progesterona regulam diretamente o crescimento e a estrutura dos vasos sanguíneos endometriais (Rogers e Abberton, 2003). O estrógeno estimula a síntese de NO (Huang *et al.*, 2000) e, com relação à progesterona, há poucos estudos sobre seus efeitos na rede vascular útero-placentária. O que se sabe é que ela influencia indiretamente o remodelamento vascular, recrutando células do sistema imunológico, como linfócitos, macrófagos e células NKs para o endométrio (Sentman *et al.*, 2004).

Os fatores anti-angiogênicos também são expressos na placenta em desenvolvimento. Nas células do espongiotrofoblasto, uma proteína solúvel, a sFlt-1, se liga ao VEGF expresso pelas células trofoblásticas gigantes e atua como antagonista da ligação do VEGF ao seu receptor (He *et al.*, 1999; Maynard *et al.*, 2003). Já a rPlf, originalmente denominada PRP, antagoniza os efeitos angiogênicos da proliferin (Jackson *et al.*, 1994). Similar à expressão da sFlt-1, a rPlf é expressa pelo espongiotrofoblasto, mas também pela camada de células gigantes trofoblásticas. Postula-se que a expressão de fatores anti-angiogênicos logo abaixo da camada de células gigantes impeça o crescimento do endotélio materno dentro da camada do espongiotrofoblasto (Plaisier *et al.*, 2009).

O oxigênio é um importante regulador do equilíbrio entre as funções do VEGF e do PGF. Em humanos e roedores, na placenta e nos tecidos corioalantoídeos relacionados, o VEGF é regulado pela hipóxia e reprimido pelo excesso de oxigênio. No primeiro trimestre do desenvolvimento placentário em humanos,

ocorre um ambiente de relativa hipóxia que estimula a proliferação do citotrofoblasto e inibe a invasão trofoblástica. Com base nisso, foi verificado que um dos principais eventos que dão origem à pré-eclâmpsia é o fracasso do trofoblasto em invadir as artérias espiraladas com subsequente isquemia placentária. Ratas com redução da perfusão uterina apresentam aumento da pressão arterial, aumento plasmático e placentário de sFlt-1 e redução das concentrações plasmáticas de PGF e de VEGF (Smith e Wear, 2009).

Existem várias outras vias importantes de sinalização que modulam a angiogênese e que não serão discutidas nesta revisão, uma vez que não fizeram parte do escopo deste estudo. Essas vias são representadas pelos prostanóides (Jabbour *et al.*, 2006), angiotensina (Sugawara e Ito, 2006) e integrinas (Bayless e Davis, 2003).

7. Efeito dos hormônios tireoidianos na gestação

Os hormônios tireoidianos são vitais para a função reprodutiva normal. Além de atuar no tecido ovariano e uterino, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) agem diretamente no tecido placentário, via receptores específicos, modulando o metabolismo e o desenvolvimento desse órgão (Evans *et al.*, 1983; Mukku *et al.*, 1983; Mauro *et al.*, 1992; Kilby *et al.*, 1998; Galton *et al.*, 2001; James *et al.*, 2007). A presença de receptores alfa e beta específicos para T3 no núcleo das células trofoblásticas e do estroma da placenta sugere a participação direta desse hormônio sobre esse tecido (Calvo *et al.*, 1992; Kilby *et al.*, 1998). Desse modo, o hormônio tireoidiano de origem materna influencia o desenvolvimento fetal não só pelo fato de o feto depender dele durante um período da sua vida, para o seu desenvolvimento, mas por agir diretamente no desenvolvimento do tecido placentário (Kilby *et al.*, 1998).

A síntese de T3 e T4, bem como os mecanismos reguladores dessa síntese e da liberação desses hormônios, são semelhantes em humanos e animais (Choksi *et al.*, 2003). O hormônio estimulador da tireoide (TSH), que é secretado pela parte distal da adeno-hipófise, regula a síntese e a secreção desses hormônios. Já o hormônio liberador da tireotropina (TRH) é

secretado pelo hipotálamo e regula a secreção de TSH hipofisário. O TSH, o TRH e os hormônios tireoidianos vão formar o eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano (HPT), de forma que o controle das concentrações circulantes dos hormônios tireoidianos vai ser regulada por mecanismos de *feedback* (Scanlon e Toft, 2000). Em geral, o aumento das concentrações sanguíneas dos hormônios da tireoide inibe a liberação de TRH e TSH, ocorrendo o contrário quando os níveis séricos dos hormônios tireoidianos diminuem (Choksi *et al.*, 2003).

A T3 e a T4 são compostas de dois resíduos tirosil, unidos por uma ligação de éter, e substituídas por três ou quatro resíduos de iodo, respectivamente. A T3 é o hormônio biologicamente ativo, enquanto T4, que é o principal hormônio secretado pela tireoide, é considerado um precursor da T3 ou pró-hormônio. A deiodinação de T4 nos tecidos (por exemplo, no fígado) leva à produção de T3 e T3 reverso (rT3). rT3 não tem atividade biológica conhecida (Choksi *et al.*, 2003), enquanto T3 efetua sua ação através da sua ligação a quatro receptores específicos, TR α 1, TR β 1, TR β 2 e TR β 3, sendo que a presença deles varia de acordo com o tecido (Harvey e Williams, 2002).

Quando liberados na corrente sanguínea, T3 e T4 se ligam reversivelmente a três diferentes proteínas transportadoras que são produzidas no fígado: tireoglobulina (TBG), transtirretina (TTR) e albumina (Robbins, 2000). As lipoproteínas também podem se ligar a uma pequena fração dos hormônios da tireoide. No entanto, a principal proteína transportadora nos seres humanos é a TBG, devido a sua maior afinidade aos hormônios tireoidianos (Kaneko, 1989; Robbins, 2000). Já nos roedores é a albumina, uma vez que apesar da TBG apresentar alta afinidade para T3 e T4, sua concentração plasmática é pequena nessas espécies (Tani *et al.*, 1994). Entretanto, os níveis de TBG em humanos e ratos aumentam durante a gestação, ao contrário do que ocorre em camundongos, nos quais o nível de TBG diminui (Choksi *et al.*, 2003).

A principal função de T3 é regular o metabolismo de carboidratos e proteínas em todas as células. Assim, alterações no nível plasmático de T3 podem afetar todos os órgãos e sistemas orgânicos, com efeitos importantes

sobre os sistemas cardiovascular, nervoso, imunológico e genital. O efeito dos hormônios tireoidianos sobre a função reprodutiva e sobre a fertilidade e o desenvolvimento fetal têm sido amplamente investigado, por meio da avaliação dos resultados adversos encontrados em indivíduos com disfunções da tireoide e pela indução experimental dessas disfunções em animais de laboratório (Choksi *et al.*, 2003).

Em adultos, os mecanismos moleculares que afetam o metabolismo hormonal do estrogênio, a maturação sexual, o ciclo estral, a ovulação, a fertilidade e a habilidade materna, envolvem a modulação de vias de transcrição induzidas por T3 e por fatores que afetam o perfil hormonal da fêmea (Krassas, 2000). Por exemplo, T3 estimula a produção da globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG), que faz o transporte sanguíneo de testosterona, diidrotestosterona e de estradiol. Assim, o aumento de T3 resulta na elevação sérica dos esteroides circulantes (Krassas, 2000).

Em fetos humanos, os hormônios tireoidianos têm pouco ou nenhum efeito sobre o desenvolvimento do sistema genital da fêmea, ao contrário do que se observa em roedores (Choksi *et al.*, 2003). Alterações adaptativas da tireoide materna ocorrem durante a gestação, em resposta à necessidade de prover ao feto T3 e T4 até que o sistema hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano fetal esteja funcional (18^o a 20^o semana de gestação em humanos e a partir do 17^o dia de gestação na rata) (Obregón *et al.*, 1984; Obregón *et al.*, 2007). Para isso, a tireoide materna aumenta de volume, bem como sua captação de iodeto (Versloot *et al.*, 1997). Além disso, os níveis de estrogênio estimulam a expressão da TBG no fígado e quase duplicam a sua concentração sérica. O aumento sérico de TBG ocorre de forma concomitante ao aumento das concentrações séricas totais de T3 e T4 (Karabinas e Tolis, 1998).

As deiodinases presentes na placenta humana e de roedores rapidamente metabolizam a T4 materna para T3 para ser usada pelo feto. Entretanto, uma quantidade significativa de T4 também é transferida para o feto (Chan e Kilby, 2000). A placenta é livremente permeável ao iodeto e ao TRH, mas não ao TSH. Admite-se que o TRH materno transferido ao feto possa ter participação importante no controle da função tireoidiana fetal antes da maturação completa do

seu HPT. Já está comprovado que as isoformas do receptor tireoidiano estão presentes na placenta e sua expressão aumenta com a idade fetal (Chan e Kilby, 2000; Leonard e Koehrl, 2000). Em humanos, ao final do primeiro trimestre de gestação, a concentração sérica materna de hCG, produzida pela placenta, é suficiente para se ligar ao receptor para TSH e estimular parcialmente a atividade do HPT materno. A ativação do receptor para TSH pela hCG estimula a síntese de T4, diminui os níveis séricos de TSH e aumenta os níveis de T4 livre, efeito que é intensificado por gestações gemelares (Choksi *et al.*, 2003).

Em animais de laboratório, o nível de T3 influencia o controle do ciclo estral, o comportamento, a manutenção da gestação, o crescimento fetal e a lactação (Vasudevan *et al.*,

2002). Além disso, a T3 é necessária para a transição da fase de estro para o estado de anestro sazonal em alguns animais em idade reprodutiva (Nakao *et al.*, 2008). Em ovelhas, por exemplo, a T3 precisa estar presente no final da época de reprodução para iniciar o anestro. No entanto, esse hormônio não desempenha papel na manutenção e duração do anestro (Vasudevan *et al.*, 2002).

Assim, devido à influência dos hormônios tireoidianos na função normal de diversos tecidos e órgãos, as disfunções da tireoide estão associadas a várias alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, incluindo os distúrbios reprodutivos e do desenvolvimento em seres humanos e em animais de laboratório (Choksi *et al.*, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos das disfunções tireoidianas durante a gestação.

Hipotireoidismo	Hipertireoidismo
Infertilidade ¹ ; Aumento de abortos espontâneos ¹ ; Nascimento de neonatos prematuros ² ; Anomalias congênitas ² ; Prejuízo na decidualização ³ ; Redução do peso fetal e placentário ⁴ ; Redução do glicogênio placentário ⁵ ; Menor proliferação trofoblástica ⁴ ; Menor celularidade da placenta ⁴ ; Redução dos vasos fetais e dilatação dos seios vasculares maternos no labirinto placentário ⁴ ; Aumento da apoptose na placenta ⁴ ; Aumento do nível sérico de PRL ⁶ ; Atraso do parto ⁷ ; Redução da proliferação e da expressão de COX-2, 20 α -diidroxiprogesterona e de fatores angiogênicos no corpo lúteo ^{7,8} .	Maior taxa de gestação ⁹ ; Aumento dos níveis séricos de estrógeno, androstenediona, testosterona, LH e SHBG ² . Parto prematuro ⁹ ; Maior proliferação das células trofoblásticas ¹⁰ ; Aumento da expressão de VEGF pela placenta ¹¹ ; Aumento da vascularização uterina ¹¹ ; Aumento da proliferação e da expressão de COX-2 e de fatores angiogênicos no corpo lúteo ^{8,12} .

¹ Longcope, 1991

² Krassas, 2000

³ Galton *et al.*, 2001

⁴ Silva *et al.*, 2012

⁵ Shafrir *et al.*, 1994

⁶ Reymond *et al.*, 1987

⁷ Hapon *et al.*, 2003

⁸ Silva *et al.*, 2014

⁹ Rosato *et al.*, 1998

¹⁰ Freitas *et al.*, 2007

¹¹ Souza *et al.*, 2011

¹² Macchiarelli *et al.*, 2013

Quatro categorias de disfunção da tireoide são caracterizadas em humano: o hipotireoidismo subclínico, o hipotireoidismo clínico, o hipertireoidismo subclínico e o hipertireoidismo clínico (Braverman e Utiger, 2000; Ross, 2000; Feldkamp, 2013; Keklik *et al.*, 2013). O hipotireoidismo subclínico é caracterizado por uma concentração discretamente elevada de TSH, concentrações séricas normais de T3 e T4 e ausência ou presença discreta de sinais clínicos (Ross, 2000). Já o hipotireoidismo clínico é a desordem clínica mais comum da tireoide. Ele se caracteriza por uma concentração sérica elevada de TSH e baixa concentração sérica de T4 livre com sinais clínicos significativos (Braverman e Utiger, 2000). No hipertireoidismo subclínico, os níveis de TSH estão baixos e os de T3 e T4 estão normais, podendo apresentar sintomatologia clínica ou não (Feldkamp, 2013). O hipertireoidismo clínico é caracterizado pelo aumento de T3 e T4 e redução de TSH com sintomatologia clínica evidente (Keklik *et al.*, 2013). Em animais, o hipo e hipertireoidismo clínicos são as disfunções da tireoide mais diagnosticadas (Scott-Moncrieff, 2012), sendo que já há casos de hipotireoidismo subclínico em cães (Castillo *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2011). Entretanto, o perfil sérico de TSH e dos hormônios tireoidianos no hipotireoidismo subclínico em cães pode ser diferente dos humanos, com o TSH apresentando-se normal e T4 total e livre baixos (Valle e Fóscolo, 2012).

Em humanos, o hipotireoidismo tem a baixa ingestão de iodo como uma das suas principais causas. No entanto, em áreas onde a ingestão de iodo é adequada, a causa mais comum do hipotireoidismo é a tireoidite de Hashimoto, uma doença autoimune causada por auto-anticorpos contra a peroxidase tireoidiana. Outras doenças autoimunes e a radiação também são causas de hipotireoidismo. Já no hipertireoidismo, a causa mais comum é a doença de Graves, na qual há produção de anticorpos tireo-estimulantes (Choksi *et al.*, 2003).

A prevalência de hipotireoidismo nas mulheres em idade reprodutiva e durante a gestação é de aproximadamente 0,3 a 2,5% (Idris *et al.*, 2005). Sua incidência está associada ao atraso do início da puberdade (Styne, 1991), anovulação, cistos ovarianos, irregularidade menstrual (Poppe e Glinoe, 2003), infertilidade, aumento da frequência de abortos espontâneos (Longcope,

1991) e nascimento de neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (Krassas, 2000).

Em espécies animais como caprinos, caninos e equinos, o hipotireoidismo também tem sido apontado como uma das endocrinopatias mais frequentes e que também resulta em distúrbios reprodutivos (Piosik *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2002). Em relação ao desenvolvimento feto-placentário, alguns estudos já demonstraram que o hipotireoidismo pode afetar diretamente a taxa de gestação por prejudicar a decidualização durante a implantação (Galton *et al.*, 2001), por alterar os estoques de glicogênio placentário (Shafir *et al.*, 1994) e por afetar a expressão de *c-fos* e *c-jun* em ratas gestantes hipotireoideas (Morrish *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 1999). Expressão anormal de *c-fos* e *c-jun*, que estão associados com a diferenciação (Morrish *et al.*, 1997) e a proliferação trofoblástica (Leonard *et al.*, 1999), respectivamente, pode estar relacionada à disfunção placentária, uma vez que a expressão desses fatores está elevada na placenta de mulheres com pré-eclampsia ou com restrição do crescimento intra-uterino (Faxen *et al.*, 1997). Silva *et al.* (2012) verificaram também que a hipofunção tireoidiana aumenta a população de células de glicogênio no espongiotrofoblasto, interfere com o desenvolvimento vascular do labirinto placentário, reduz a atividade proliferativa e a celularidade da placenta e aumenta a taxa de apoptose no disco placentário. Suspeita-se que haja falha na diferenciação e na cinética de migração das células trofoblásticas durante a gestação em condições de hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2012).

Embora o hipotireoidismo materno influencie o crescimento feto-placentário em ratas, o resultado vai depender do tempo de início do quadro em relação à concepção e do grau de hipotireoidismo. A tireoidectomia de ratas antes da gestação não tem nenhum efeito sobre o peso placentário, mas retarda o crescimento fetal nos quadros de hipotireoidismo moderado ou acentuado, transiente ou permanente (Morreale de Escobar *et al.*, 1985; Leonard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 1999). Já a indução de hipotireoidismo materno moderado ou acentuado, logo após a concepção, retarda permanentemente o crescimento fetal e o peso placentário (Porterfield *et al.*, 1975; Bonet e

Herrera, 1988; Hendrich e Porterfield, 1992; Pickard *et al.*, 2003).

Algumas pesquisas demonstraram que o hipotireoidismo aumenta os níveis de PRL em modelos animais experimentais (Jahnke *et al.*, 1980; Reymond *et al.*, 1987). A expressão do TRH, que regula tanto a secreção do TSH como as secreções de PRL, pode ser influenciada pela tireoidectomia. A PRL é um hormônio luteotrópico (LTH) no roedor e que estimula a síntese de progesterona (Rothchild, 1981). Além disso, um aumento nos níveis de PRL inibe a secreção normal de LH no ser humano (Cheung, 1983) e reduz, em ratos, a resposta da hipófise ao hormônio liberador de LH (LHRH) (Stradtman, 1993).

Ratas gestantes tratadas com droga anti-tireoidiana também apresentam atraso no parto e redução do número de filhotes. O atraso no parto é resultante da diminuição da síntese da 20α -diidroxiprogesterona pelo corpo lúteo, de modo que ocorre um prolongamento da fase luteal induzida pela supressão do catabolismo da progesterona (Hapon *et al.*, 2003). Silva *et al.* (2014) também observaram atraso da expressão gênica e proteica de COX-2 pelo corpo lúteo de ratas gestantes hipotireóideas, como também redução da atividade proliferativa e angiogênica. É interessante notar que ratas gestantes hipertireóideas apresentam parto prematuro causado por luteólise prematura, ao contrário de ratas hipotireóideas que tem prolongamento da fase luteal (Rosato *et al.*, 1998; Hapon *et al.*, 2003; Navas *et al.*, 2011). Ratas gestantes

hipertireóideas apresentam aumento precoce de COX-2 produzida pelo corpo lúteo e maior atividade angiogênica luteal (Macchiarelli *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014).

Em relação ao hipertireoidismo, estudos mostram que há alteração significativa dos níveis de esteroides sexuais. A hiperfunção tireoidiana está associada ao aumento dos níveis plasmáticos de estrógeno, androstenediona e testosterona, a partir do aumento da síntese de androstenediona e testosterona, diminuição da depuração de 17β -estradiol e aumento do metabolismo de androstenediona para estrona e testosterona em estradiol (Krassas, 2000). Os níveis séricos de LH e da SHBG também aumentam em mulheres com hipertireoidismo (Krassas, 2000).

Em ratas, foi demonstrado que o hipertireoidismo aumenta a taxa de gestação e a proliferação de células trofoblásticas sem afetar a viabilidade fetal (Rosato *et al.*, 1992; Freitas *et al.*, 2007). Em marrãs, o hipertireoidismo aumenta a expressão de VEGF placentário e a vascularização uterina, sem, no entanto, alterar o número e o desenvolvimento dos fetos (Souza *et al.*, 2011).

Embora já se tenha estudos sobre o efeito das disfunções tireoidianas na função reprodutiva da mulher e de algumas espécies de animais domésticos e, principalmente, na atividade ovariana, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais o hipo e o hipertireoidismo alteram a função placentária.

CAPÍTULO 2

A disfunção tireoidiana materna em ratas afeta o perfil imune placentário dos receptores *Toll-like 2 e 4* e de citocinas pro e anti-inflamatórias

Maternal thyroid dysfunction in rats affects placental immune profile of Toll-like receptors 2 and 4 and pro- and anti-inflammatory cytokines

RESUMO

A resposta imune materna é um determinante crucial para o sucesso ou falha da gestação, podendo as disfunções tireoidianas causar parto prematuro e aborto. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica de fatores envolvidos na atividade imunológica da placenta de ratas com hipotireoidismo e excesso de T4. Setenta e duas ratas adultas foram divididas igualmente nos grupos hipotireoideo, tratado com L-tiroxina e eutireoideo (controle). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil. Os animais foram eutanasiados aos 10, 14 e 19 dias de gestação. Avaliou-se a expressão imunistoquímica de INF γ , MIF e iNOS. Nos discos placentários foi avaliada a expressão de INF γ , TLR2 e 4, MIF, TNF α , IL-10 e iNOS pelo RT-PCR tempo real. Os dados foram analisados pelo teste SNK. O hipotireoidismo reduziu a expressão gênica e/ou proteica de TLR4, de fatores pró (INF γ) e anti-inflamatórias (IL-10, iNOS) e aumentou a expressão de TLR2 ($P < 0,05$). O excesso de T4 não só aumentou a expressão gênica e/ou proteica dos fatores anti-inflamatórios IL-10 e iNOS, como reduziu, aos 10 dias, a expressão dos fatores pró-inflamatórios TNF α e MIF ($P < 0,05$). No entanto, aos 19 dias de gestação, os fatores pró-inflamatórios INF γ e MIF aumentaram nas ratas tratadas com T4 ($P < 0,05$). Conclui-se que o hipotireoidismo e o excesso de T4 afetam diferentemente o perfil imunológico da placenta, sendo estes efeitos dependentes do período gestacional.

Palavras-chave: disfunção tireoidiana, gestação, trofoblasto, imunologia, rata

ABSTRACT

The maternal immune response is a crucial determinant for the success or failure of pregnancy, being that thyroid dysfunctions can cause abortion and preterm labor. The objective of this study was to evaluate the gene and protein expression of factors involved in immune activity of the placentas in hypothyroid and T4-treated rats. Seventy-two adult female rats were divided equally in the groups hypothyroid, T4-treated and euthyroid (control). The hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil. The animals were sacrificed at 10, 14 and 19 days of gestation. The immunohistochemical expression of INF γ , MIF, and iNOS was evaluated. In placental discs was evaluated the expression of INF γ , TLR2 and 4, MIF, TNF α , IL-10, and iNOS by real time RT-PCR. The data were analyzed by SNK test. Hypothyroidism reduced gene and/or protein expression of pro- (INF γ) and anti-inflammatory factors (IL-10, iNOS), increased TLR2 expression and reduced TLR4 expression ($P < 0.05$). The excess of T4 not only increased gene and/or protein expression of the anti-inflammatory factors IL-10 and iNOS, as reduced at 10 days the expression of the pro-inflammatory factors TNF α and MIF ($P < 0.05$). However, at 19 days gestation, the pro-inflammatory factors INF γ and MIF increased in T4-treated rats ($P < 0.05$). In conclusion, hypothyroidism and excess of T4 differentially affect the immune profile of the placenta, and these effects are dependent of the gestational period.

Keywords: thyroid dysfunction, pregnancy, trophoblast, immunology, rat

INTRODUÇÃO

A resposta imune materna é um determinante crucial do sucesso ou falha da gestação (Koga *et al.*, 2009). Alterações no perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias na interface materno-fetal são causas de aborto, parto prematuro, restrição de crescimento intra-uterino e pré-eclâmpsia em mulheres e em modelos animais experimentais (Coulam, 2000; Toder *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2009). Contudo, pouco se sabe sobre a influência das disfunções tireoidianas na resposta imune sistêmica (Gomes *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2011) e, particularmente, no sistema imune placentário.

A hipofunção tireoidiana afeta o desenvolvimento feto-placentário por prejudicar a decidualização, a vascularização e o desenvolvimento placentário, e por aumentar a apoptose e reduzir a proliferação das células trofoblásticas (Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Galton *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2012). No entanto, vários destes processos patológicos observados no hipotireoidismo podem ser resultantes de alterações no perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias placentárias (Koga *et al.*, 2009). Alteração no perfil destas citocinas já foi visto em outras condições patológicas como na pré-eclâmpsia e no aborto (Todros *et al.*, 2005; Holmlund *et al.*, 2007; Koga *et al.*, 2009). O hipertireoidismo, pelo contrário, aumenta a eficiência reprodutiva em modelos animais experimentais (Serakides *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007) e causa alterações importantes no que concerne à vascularização uterina (Souza *et al.*, 2011) e proliferação das células trofoblásticas (Freitas *et al.*, 2007). Já foi confirmado que alterações no perfil imunológico placentário afetam a vascularização da interface materno-fetal (Zhang *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Até o presente momento, não há pesquisas que tenham avaliado o perfil imune placentário de animais com hipo e hipertireoidismo.

Durante a gestação ocorre supressão do sistema imune materno. Há uma significativa redução da imunidade celular (Weinberg, 1987; Raghupathy, 1997), com um predomínio de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e iNOS, condição essencial para o sucesso da gestação (Coulam, 2000; Toder *et al.*, 2003). Isto é crucial para prevenir a rejeição ao feto (Murphy

et al., 2004). Contudo, embora previna a sua rejeição, aumenta a susceptibilidade do feto a diversos agentes infecciosos (Kim *et al.*, 2005).

Na mulher e nas espécies animais domésticas, a resposta imune inata na interface materno-fetal pode ter um impacto significativo sobre o sucesso da gestação, uma vez que infecções intrauterinas têm se mostrado fortemente associadas com certos distúrbios metabólicos da gestação (Koga *et al.*, 2009). O reconhecimento de antígenos bacterianos pelas células trofoblásticas é mediado por vários receptores de membrana, principalmente os receptores Toll-like (TLRs) (Flo *et al.*, 2002). O estímulo destes receptores, particularmente do TLR2 e TLR4, vai resultar em apoptose e produção de citocinas inflamatórias pelas células trofoblásticas, respectivamente (Koga *et al.*, 2009). Contudo, não se sabe sobre a influência das disfunções tireoidianas na expressão destes receptores. Tem sido observado que os TLRs estão associados a complicações gestacionais, particularmente na patogênese da pré-eclâmpsia, do parto prematuro e até mesmo na falha do desenvolvimento fetal (Koga e Mor, 2010; Xie *et al.*, 2010). Uma hipótese deste estudo é de que a expressão dos receptores TLRs nas células trofoblásticas esteja comprometida no hipotireoidismo. Isto poderia comprometer o desenvolvimento feto-placentário não só por influenciar a permanência do feto no ambiente uterino como também por facilitar a infecção do mesmo por patógenos.

Tem sido demonstrado que algumas citocinas pró-inflamatórias, como o INF γ e o MIF, são importantes componentes da resposta imune placentária. O INF γ estimula a atividade fagocitária de macrófagos e de células gigantes trofoblásticas contra microorganismos (Ashkar *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). Além disso, afeta diretamente a função das células *Natural Killer* uterinas que estão envolvidas na função imune placentária e na dinâmica vascular (Hu e Cross, 2010). Já o MIF estimula a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e NO (Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012), além de estimular a angiogênese e a proliferação celular e suprimir a apoptose (Amin *et al.*, 2003; Viganò *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Os níveis séricos de MIF estão aumentados em mulheres com pré-eclâmpsia (Todros *et al.*, 2005). Outra hipótese

deste trabalho é a de que as disfunções tireoidianas afetam a expressão placentária de INF γ e MIF. Isto justificaria, pelo menos em parte, as alterações placentárias no que concerne à proliferação, apoptose e vascularização observadas no hipo e hipertireoidismo (Idris *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012).

Por isso, estudar a expressão gênica e proteica de receptores TLRs e de citocinas pró- e anti-inflamatórias na placenta de ratas com disfunção tireoidiana é importante e consiste no objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 268/2011).

Indução das disfunções tireoidianas e acasalamento

Setenta e duas ratas Wistar adultas foram usadas neste estudo (Figura 1). Os animais foram alojados em caixas plásticas com seis ratas/caixa no regime de 12hs de luz e 12hs de escuro. As ratas foram alimentadas com ração comercial contendo 22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio e 0,6% de fósforo. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*.

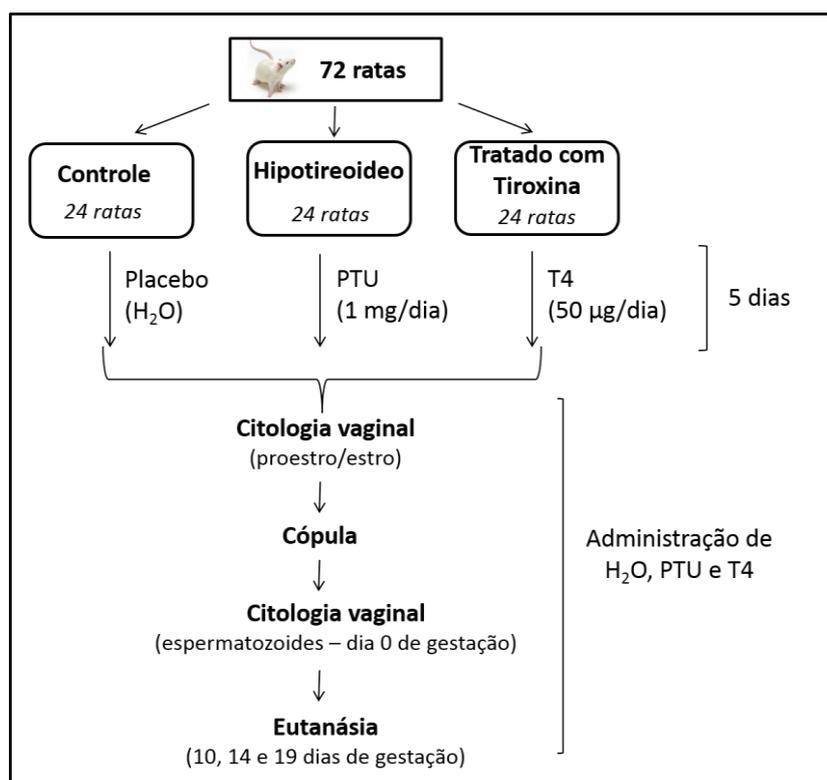


Figura 1. Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.

Depois de um período de adaptação de sete dias, as ratas foram divididas aleatoriamente em três grupos (controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina), com 24 animais por grupo.

O hipotireoidismo foi induzido pela administração de propiltiouracil (PTU)¹³ diluído em 5 mL de água destilada, de acordo com Silva

¹³ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

et al. (2004), utilizando uma sonda orogástrica (1mg/animal/dia). As ratas tratadas com tiroxina receberam L-tiroxina (T4)¹⁴ diluída em 5 mL de água destilada, como descrito por Serakides *et al.* (2001), utilizando uma sonda orogástrica (50µg/animal/dia). As ratas do grupo controle receberam 5 ml de água destilada, por dia, como placebo.

Cinco dias após o início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral. As ratas em proestro e estro foram mantidas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 h. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram obtidos para detectar espermatozoides. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, sendo esse dia considerado dia 0 de gestação. Neste período, seis ratas de cada grupo também foram eutanasiadas com uma overdose de anestésico¹⁵ para coleta de sangue, dosagem de T3 e T4 livre e confirmação da indução da disfunção tireoidiana. Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas. Os animais dos grupos hipotireoideo, tratado com tiroxina e controle continuaram a receber PTU, T4 e água, respectivamente, por sonda orogástrica, durante todo o período experimental.

Análise hormonal

Aos 0, 10, 14 e 19 dias de gestação, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com overdose de anestésico. Aos 0 e 19 dias de gestação, o sangue foi colhido com anti-coagulante (heparina) das ratas e o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C para a dosagem de T3 e T4 livre, a qual foi realizada usando a técnica de ELISA de quimiluminescência (sensibilidade: 0,4 ng/dL), com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante¹⁶.

Necropsia e coleta de material

Na necropsia, o útero foi colhido juntamente com a placenta e os fetos. Seis discos placentários com a decídua e glândula metrial/rata foram

fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Para a realização da imunistoquímica e análise morfológica, secções histológicas (4µm) dos discos placentários junto com a decídua e glândula metrial foram obtidas em lâminas silanizadas.

Três discos placentários sem decídua por rata também foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido por 24 horas e armazenados a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica de TLR2 e 4, INFγ, MIF, TNFα, IL-10 e iNOS utilizando RT-PCR tempo real. Os discos placentários eram formados unicamente pelo sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário.

Imunistoquímica

Para imunistoquímica dos discos placentários os anticorpos utilizados e suas diluições foram: anti-INFγ¹⁷ (1:200), anti-MIF¹⁸ (1:500) e anti-iNOS¹⁹ (1:100). Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase²⁰ e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando solução Retrieval. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro bloqueio²¹ e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina²². As secções foram contracordadas com hematoxilina de Harris²³. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

A intensidade e área de imunomarcção de INFγ, MIF e iNOS foram avaliadas na camada do espongiotrofoblasto e no labirinto placentário aos 14 e 19 dias de gestação. O sinciotrofoblasto não foi avaliado pelo fato da sua espessura não ser uniforme ao longo do disco placentário e por não possibilitar a aquisição de uma área padrão

¹⁴ Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

¹⁵ 2,5% Tionembutal; ABBOTT, São Paulo, Brasil

¹⁶ IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA

¹⁷ AB9657, Abcam, Cambridge, UK

¹⁸ AB7207, Abcam, Cambridge, UK

¹⁹ AB15323, Abcam, Cambridge, UK

²⁰ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA

²¹ Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

²² DAB, Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

²³ Hematoxilina de Harris, Merck, Darmstadt, DE

(mesma área) em todas as lâminas para a avaliação morfológica. A avaliação da imunistoquímica não foi realizada aos 10 dias de gestação pois as camadas da placenta ainda não estão definidas na rata neste período gestacional.

Para determinar a intensidade de imunomarcção e área marcada, imagens de seis e oito campos aleatórios/cada camada aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente, foram fotografados com um microscópio Olympus BX-40 acoplado a uma câmera digital Spot Color Vision²⁴, e a intensidade da imunomarcção e área marcada foram determinadas utilizando o software ImageJ WCIF @²⁵. *Color deconvolution* e *thresholding* foram realizadas nas imagens. Para assegurar a objetividade do processo, uma média foi obtida a partir da avaliação de três discos placentários por animal. Os dados de cada disco placentário foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada (intensidade) e área marcada em pixels.

O número de campos avaliados em cada camada da placenta foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou (Sampaio et al., 2007). Em uma lâmina de imunistoquímica da placenta do grupo controle foram determinadas a área e a intensidade de imunomarcção em pixels em 10 e 15 campos para a camada do espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. A seguir, foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação de cada variável estudada em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 campos, dependendo da camada da placenta. Após verificar que o coeficiente de variação se estabilizava (não apresenta diferença maior que 10%) em 6 e 8 campos para o espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente, este valor foi adotado para se determinar a área e intensidade de imunomarcção média de cada camada da placenta.

RT-PCR tempo real

O mRNA total dos discos placentários foi extraído usando o reagente Trizol²⁶ de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 1µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *Platinum SuperScript III qPCR Two-Step com SYBR Green*²⁷. As reações de RT-PCR foram realizadas em um termociclador *Smart Cycler II*²⁸. A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde os valores das amostras foram calculados e calibrados em relação aos valores do CT de β -actina. Os primers estão na Tabela 1. A avaliação da expressão gênica foi realizada aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 3X3 (três grupos; três períodos gestacionais) e os valores médios com o desvio padrão dos grupos experimentais foram determinados e foi realizada análise de variância (ANOVA). O teste de *Student Newman Keuls* (SNK) foi utilizado para comparar as médias dos grupos hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação ao controle. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

²⁴ SPOTTM, Sterling Heights, Michigan, EUA

²⁵ Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA

²⁶ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

²⁷ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

²⁸ Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, EUA

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.

Genes	Primers	Número de acesso
TLR2	forward 5'- CTGGAGAGGCCAGCCCTGGT -3' reverse 5'- CTCTGGCCATGCAGGCGAGG -3'	NM_198769.2
TLR4	forward 5'- GGGGCAACCGCTGGGAGAGA -3' reverse 5'- AACCAGCGGAGGCCGTGAGA -3'	NM_019178.1
INF γ	forward 5'- AGTGCTACACGCCGCTCTT -3' reverse 5'- AGTGTGCCTTGGCAGTAACAGCC -3'	NM_138880.2
MIF	forward 5'- AACACCGTCCTCCGGCCGTC -3', reverse 5'- GGCGCGGGGAACATTGGTGT -3'	NM_031051.1
TNF α	forward 5'- AGCCCGTAGCCCACGTCGTA -3', reverse 5'- CGGTGTGGGTGAGGAGCACG -3'	NM_012675.3
IL-10	forward 5'- GGCCATTCCATCCGGGGTGA -3', reverse 5'- AAGGCAGCCCTCAGCTCTCG -3'	NM_012854.2
iNOS	forward 5'- TGGTCCTGCAGGCTCACGGT -3', reverse 5'- ACTCGAGGCCACCCACCTCC -3'	NM_012611.3
β -actina	forward 5'- TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT -3' reverse 5'- CGACGAGCGCAGCGATATCGT -3'	NM_031144.2

RESULTADOS

Indução das disfunções tireoidianas

A indução do hipotireoidismo e excesso de T4 durante todo o período gestacional foi confirmado pela concentração plasmática de T3 e T4 livre nos dias 0 e 19 de gestação e pelos

sinais clínicos apresentados pelos animais. As ratas tratadas com PTU apresentaram menores níveis de T3 e T4 livre em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 2) e sinais clínicos de letargia e alopecia. As ratas tratadas com tiroxina exibiram maiores níveis de T4 livre comparado aos animais controle ($P < 0,05$) (Figura 2) e apresentaram sinais clínicos caracterizados por agressividade e exoftalmia.

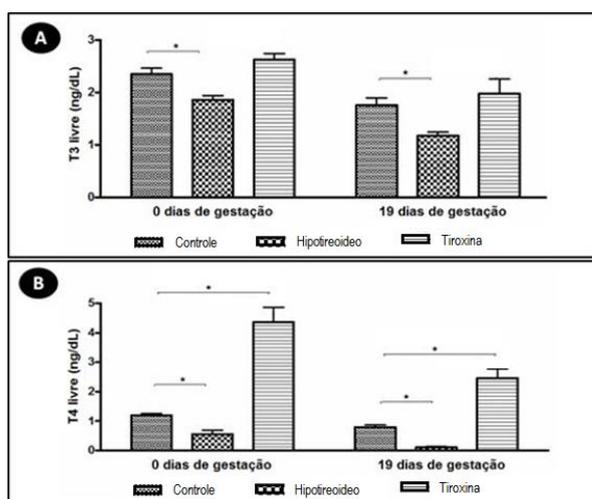


Figura 2. Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação. (* $P < 0,05$)

Expressão imunoistoquímica de INF γ , MIF e iNOS

Independente do grupo experimental, a placenta mostrou expressão de INF γ , MIF e iNOS nas três camadas (sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário) aos 14 e 19 dias de gestação. A expressão imunoistoquímica de INF γ e MIF foi nuclear e/ou citoplasmática, ao contrário da expressão de iNOS, que foi apenas citoplasmática, com uma expressão mais intensa aos 14 dias em comparação aos 19 dias de gestação (Figuras 3 a 5).

O hipotireoidismo reduziu a área e a intensidade de expressão imunoistoquímica de INF γ aos 14 e 19 dias de gestação na camada do espongiotrofoblasto em comparação com as ratas controle ($p < 0,05$) (Figura 3). Por outro lado, nos animais tratados com tiroxina, observou-se um aumento da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de INF γ no labirinto placentário aos 19 dias de gestação em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 3).

Em relação à expressão de MIF, o grupo hipotireoideo mostrou um aumento da área e intensidade de expressão imunoistoquímica na

camada do espongiotrofoblasto aos 14 dias de gestação em relação ao grupo controle, o mesmo não sendo observado aos 19 dias de gestação. Ao contrário, aos 19 dias de gestação, observou-se uma redução na área e intensidade de expressão imunoistoquímica de MIF, na camada do espongiotrofoblasto, nos animais hipotireoideos em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 4). Os animais tratados com tiroxina mostraram um aumento da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de MIF, na camada do espongiotrofoblasto, aos 14 e 19 dias de gestação em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 4). No labirinto placentário, tanto aos 14 como aos 19 dias de gestação, não houve diferenças na expressão imunoistoquímica de MIF entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 4).

Aos 14 dias de gestação, as ratas hipotireoideas mostraram uma redução da área e da intensidade de expressão imunoistoquímica de iNOS na camada do espongiotrofoblasto e labirinto placentário em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 5). As ratas tratadas com tiroxina, diferente do grupo hipotireoideo, apresentaram um aumento da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de iNOS no labirinto placentário aos 14 dias de gestação em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 5).

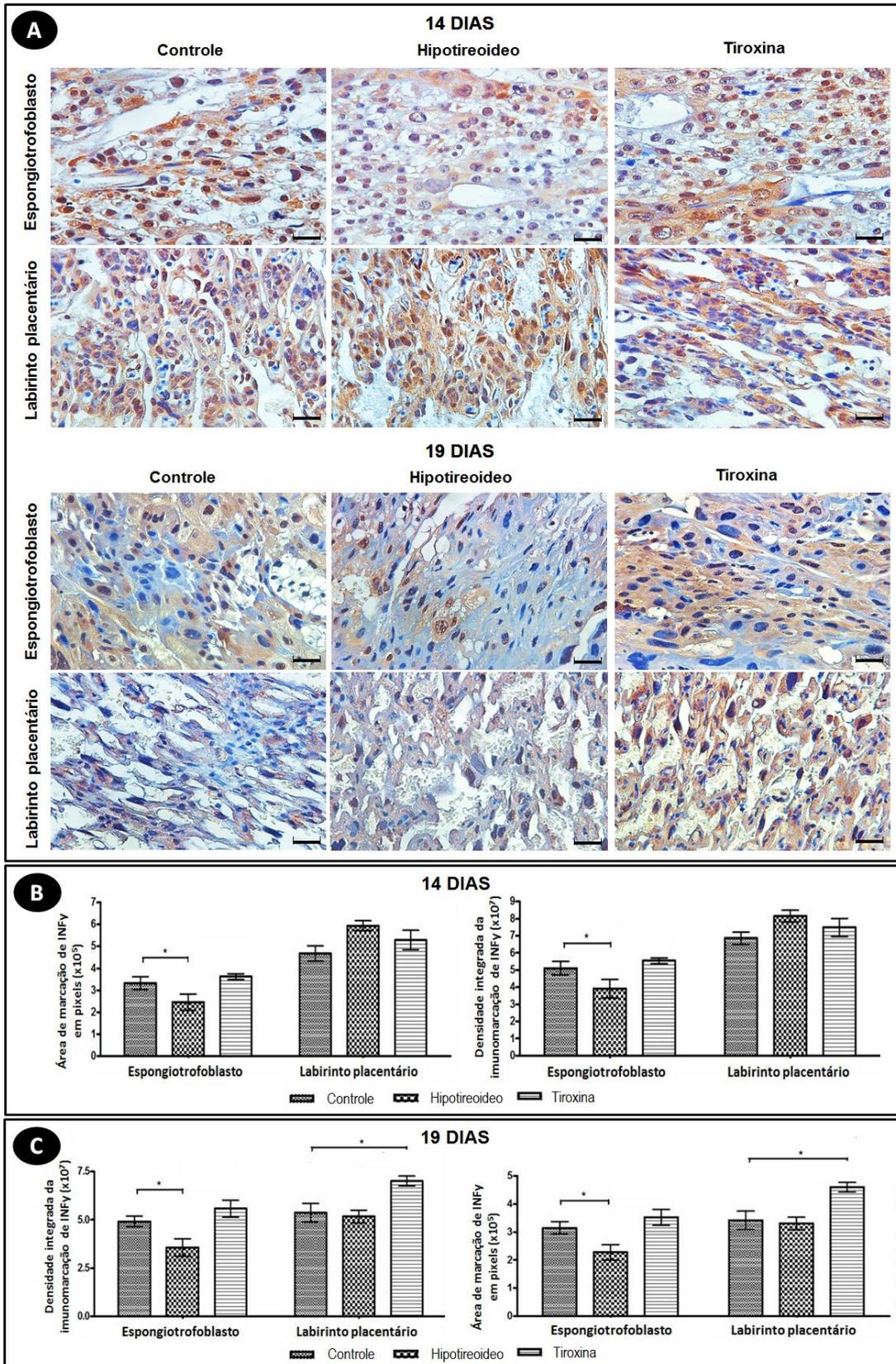


Figura 3. Expressão de INFy na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunoistoquímicas da expressão de INFy (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm.) B e C) Redução da área e intensidade de expressão de INFy na camada do espongiotrofoblasto do grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle aos 14 e 19 dias de gestação. Aumento da área e intensidade de expressão de INFy no labirinto placentário do grupo tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação. (*P<0,05)

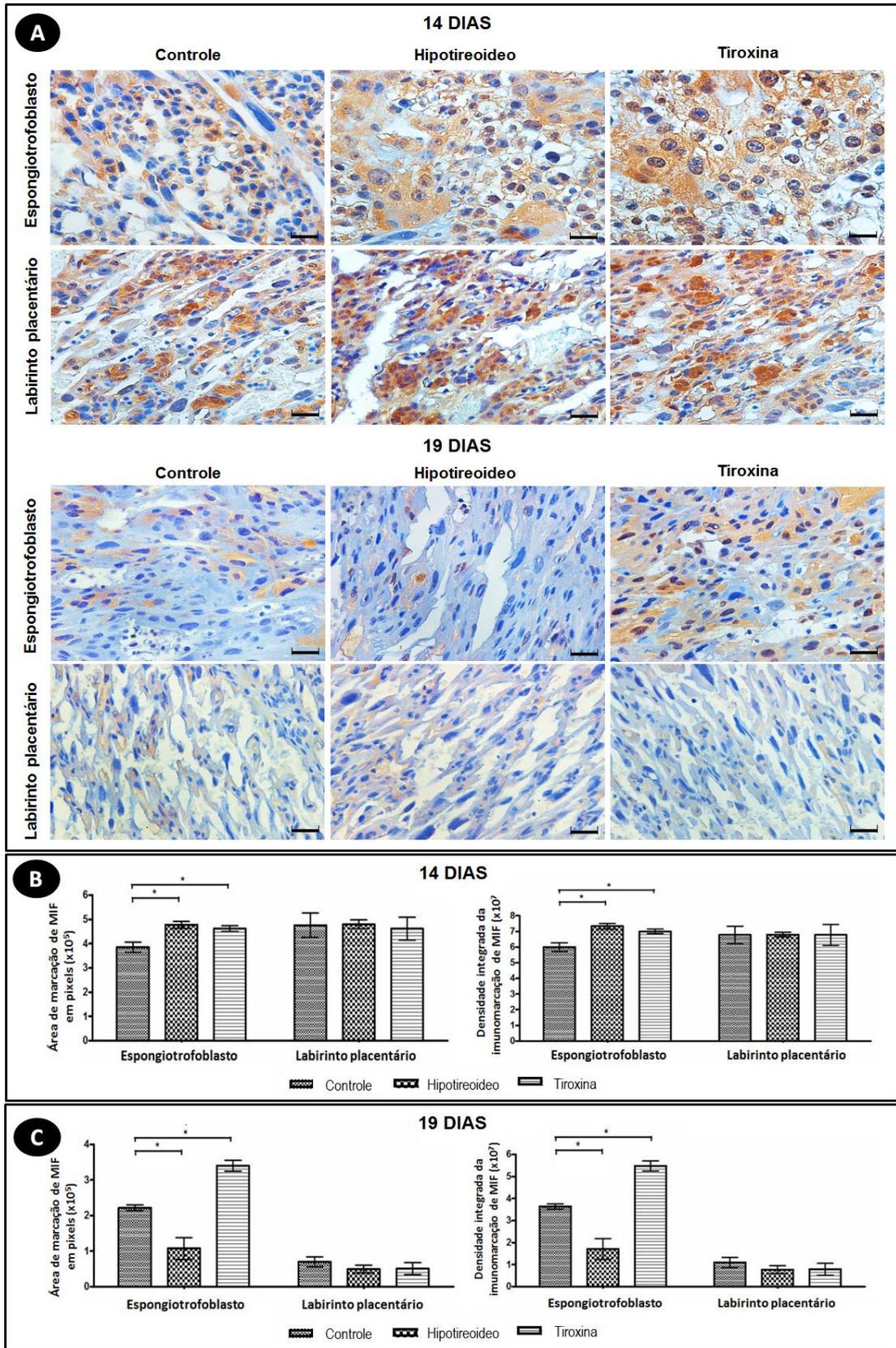


Figura 4. Expressão de MIF na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunohistoquímicas da expressão de MIF (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contraincolorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm). B e C) Aumento da área e intensidade de expressão de MIF na camada do espongiotrofoblasto dos grupos hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Redução no grupo hipotireoideo e aumento no grupo tratado com tiroxina da área e intensidade de expressão de MIF na camada do espongiotrofoblasto em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação. (*P<0,05)

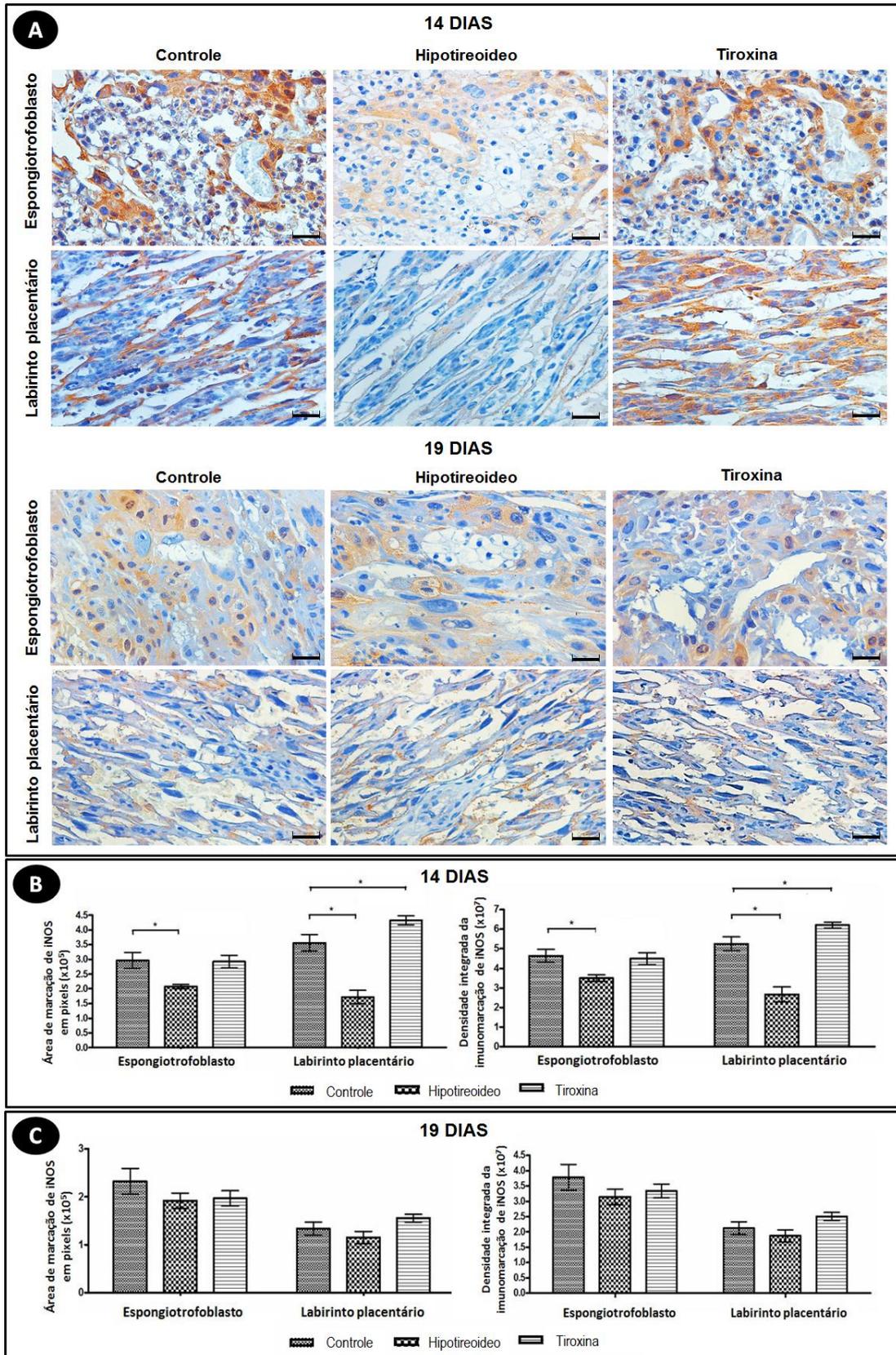


Figura 5. Expressão de iNOS na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunoistoquímicas da expressão de iNOS (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm). B e C) Redução da área e intensidade de expressão de iNOS na camada do espongiotrofoblasto e labirinto placentário do grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Aumento da área e intensidade de expressão de iNOS no labirinto placentário do grupo tratado com tiroxina em relação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. (*P<0,05)

Expressão gênica dos receptores Toll-Like 2 e 4

Nos três grupos experimentais, a expressão gênica para TLR2 na placenta diminuiu no decorrer da gestação. Contudo, aos 14 dias de gestação, os discos placentários dos animais h

ipotireoideos apresentaram aumento da expressão de mRNA para TLR2 em relação às ratas controle ($P < 0,05$). Por outro lado, o grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças quanto à expressão gênica para TLR2 em comparação ao grupo controle, em nenhum dos períodos gestacionais ($P > 0,05$) (Figura 6A).

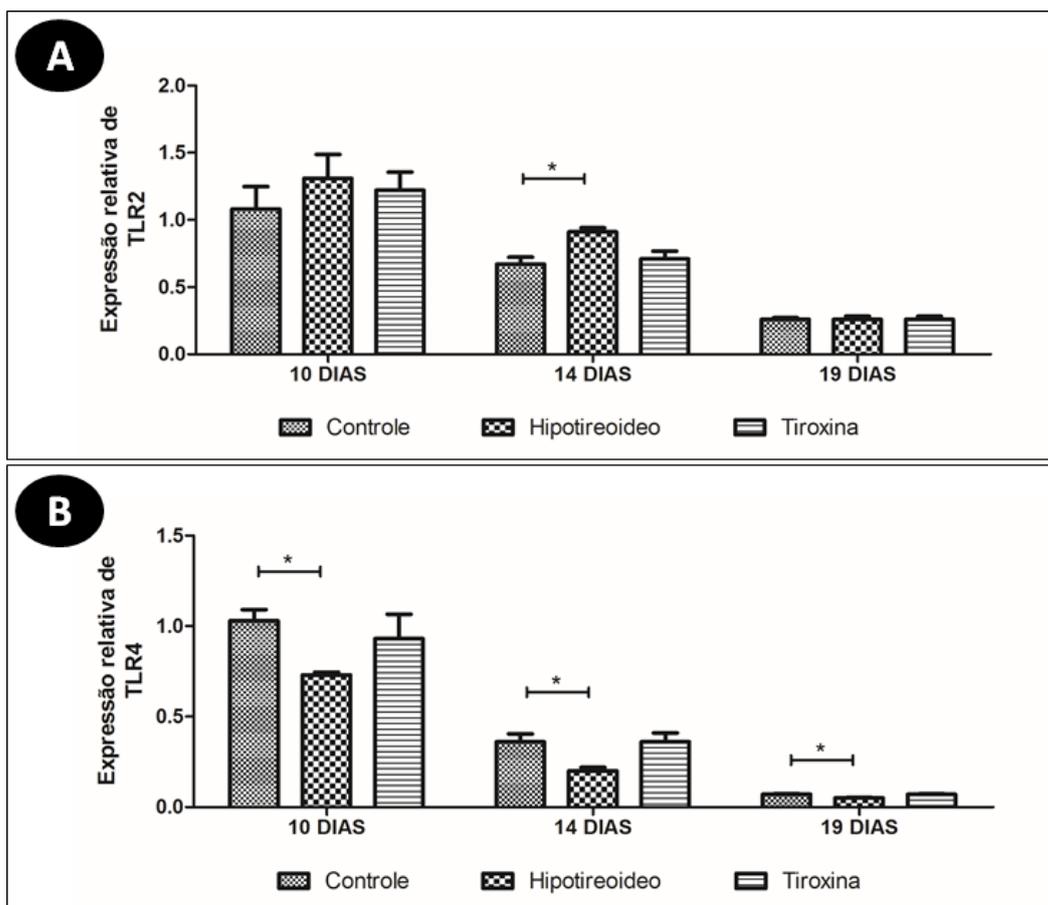


Figura 6. A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para TLR 2 (A) e 4 (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (* $P < 0,05$)

Similar ao que observou-se para a expressão gênica do TLR2, a expressão de TLR4 também diminuiu no decorrer da gestação nos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina. No entanto, o grupo hipotireoideo apresentou uma redução da expressão de mRNA aos 10, 14 e 19 dias de gestação em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 6B). O grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças na expressão gênica de TLR-4 em comparação ao grupo

controle em nenhum dos períodos gestacionais ($P > 0,05$) (Figura 6B).

Expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias $INF\gamma$, MIF e $TNF\alpha$

Com o avançar da gestação, os animais hipotireoideos apresentaram uma redução da expressão de mRNA para $INF\gamma$ aos 10 e 14 dias de gestação em relação às ratas controle ($P < 0,05$), diferente do grupo tratado com tiroxina

que apresentou aumento da expressão gênica para INF γ em comparação ao grupo controle aos 19 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 7A).

Já em relação à expressão gênica de MIF, os três grupos experimentais apresentaram maior expressão aos 14 dias de gestação. No entanto, diferente da expressão gênica para INF γ , as ratas hipotireóideas não apresentaram diferenças na expressão gênica para MIF em relação às ratas controle em nenhum dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$) (Figura 7B). Já o grupo tratado com tiroxina apresentou redução da expressão do mRNA para MIF em comparação ao grupo controle aos 10 dias de gestação, o que não foi observado aos 19 dias de gestação, onde ocorreu aumento da expressão gênica do MIF em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 7B).

No decorrer da gestação, a expressão gênica para TNF α nos grupos controle, hipotireóideo e tratado com tiroxina foi maior no dia 10 em relação aos 14 e 19 dias de gestação. Os animais hipotireóideos não apresentaram diferenças em relação às ratas controle em nenhum dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$), ao contrário dos animais com excesso de T4 que apresentaram redução da expressão do mRNA para TNF α em comparação ao grupo controle aos 10 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 7C). Aos 14 e 19 dias de gestação não houve diferenças na expressão gênica para TNF α entre os grupos

controle e tratado com tiroxina ($P > 0,05$) (Figura 7C).

Expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e iNOS

Com o avançar da gestação, a expressão gênica para TNF α nos três grupos experimentais foi maior aos 10 dias de gestação em relação aos outros períodos gestacionais avaliados. Contudo, os animais hipotireóideos apresentaram redução da expressão gênica para IL-10 aos 14 dias de gestação em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 8A). Os animais tratados com tiroxina, em contrapartida, apresentaram aumento da expressão gênica para IL-10 em comparação aos animais controle aos 10 e 19 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 8A).

A expressão gênica de iNOS na placenta durante a gestação nos grupos controle, hipotireóideo e tratado com tiroxina foi maior no dia 14 em relação aos 10 e 19 dias de gestação. No entanto, aos 14 dias de gestação, similar à expressão de IL-10, os animais hipotireóideos também apresentaram redução da expressão do mRNA para iNOS em relação às ratas controle ($P > 0,05$) (Figura 8B). O grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças quanto à expressão gênica para iNOS em comparação ao grupo controle em nenhum dos períodos gestacionais ($P > 0,05$) (Figura 8B).

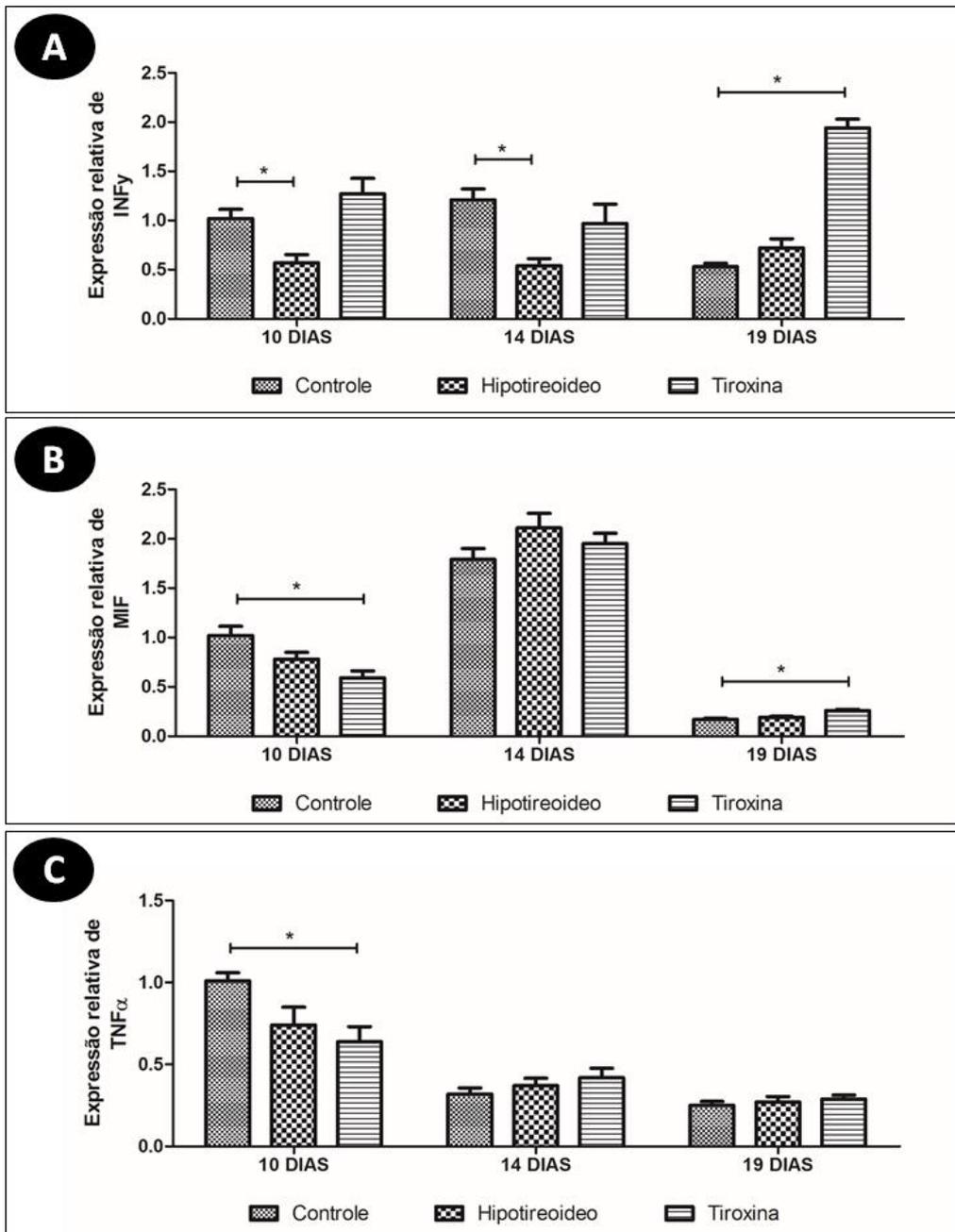


Figura 7. A, B e C) Expressão relativa de transcritos gênicos para $INF\gamma$ (A), MIF (B) e $TNF\alpha$ (C) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (* $P < 0,05$)

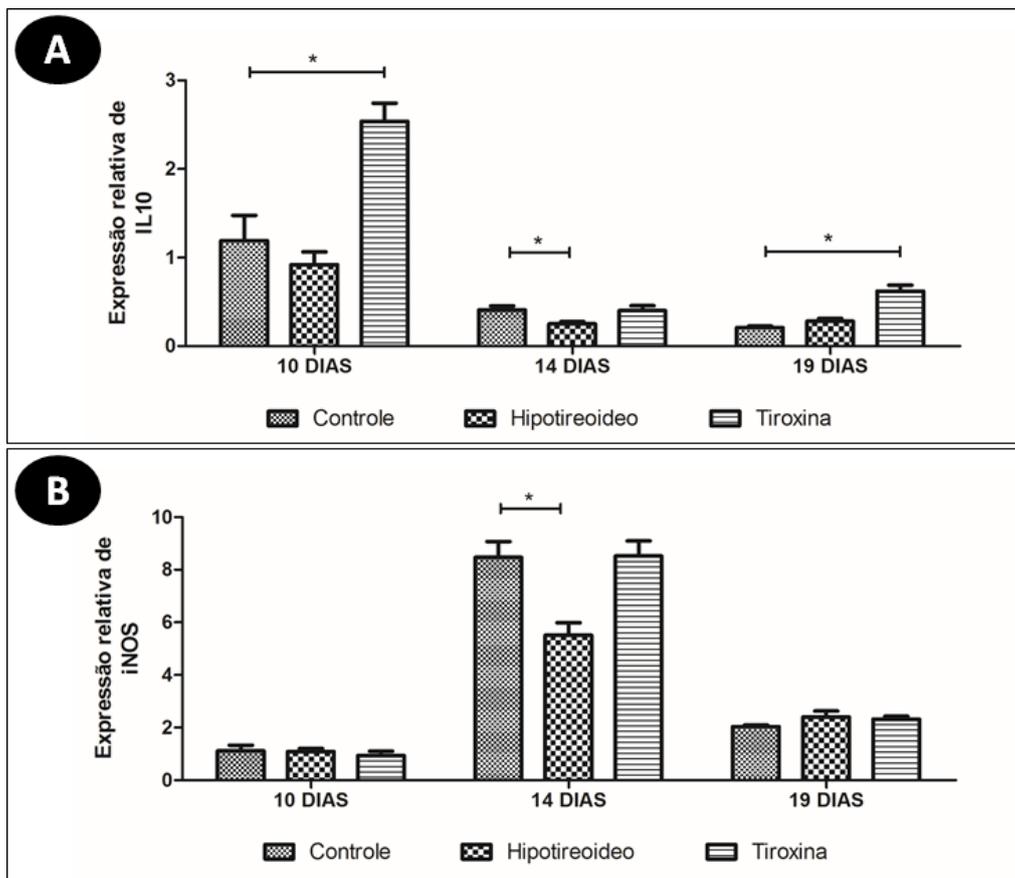


Figura 8. A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para IL-10 (A) e iNOS (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação. (*P<0.05)

Em resumo, as ratas hipotireoideas e tratadas com tiroxina apresentaram variações na expressão gênica e/ou proteica de receptores *toll*

like e mediadores inflamatórios na placenta em relação às ratas controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos do hipotireoidismo e excesso de T4 na expressão de receptores *toll like* e mediadores inflamatórios na placenta de ratas em relação ao grupo controle.

Receptores <i>Toll like</i>	Hipotireoidismo			Excesso de T4		
	10 dias	14 dias	19 dias	10 dias	14 dias	19 dias
TLR2	-	↑	-	-	-	-
TLR4	↓	↓	↓	-	-	-
Mediadores pró-inflamatórios	Expressão gênica					
	10 dias	14 dias	19 dias	10 dias	14 dias	19 dias
INF γ	↓	↓	-	-	-	↑
MIF	-	-	-	↓	-	↑
TNF α	-	-	-	↓	-	-
	Expressão imunoistoquímica					
	14 dias		19 dias		19 dias	
	EP	LP	EP	LP	EP	LP
INF γ	↓	-	↓	-	-	↑
MIF	↑	-	↓	-	↑	-
Mediadores anti-inflamatórios	Expressão gênica					
	10 dias	14 dias	19 dias	10 dias	14 dias	19 dias
IL10	-	↓	-	↑	-	↑
iNOS	-	↓	-	-	-	-
	Expressão imunoistoquímica					
	14 dias		19 dias		19 dias	
	EP	LP	EP	LP	EP	LP
iNOS	↓	↓	-	-	↑	-

DISCUSSÃO

O hipotireoidismo e excesso de T4 afetaram diferentemente o perfil imune placentário, sendo os efeitos dependentes do período gestacional. As alterações observadas no perfil imunológico placentário em ratas com hipotireoidismo e excesso de T4 podem explicar, pelo menos em parte, as alterações feto-placentárias observadas em mulheres e animais com disfunção tireoidiana (Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Galton *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012), como a redução do peso placentário e fetal observado em ratas com hipotireoidismo e o parto prematuro observado em ratas hipertireoideas (Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012).

A maior expressão gênica de TLR2 observada na placenta dos animais hipotireoideos justifica o aumento da apoptose observado por Silva *et al.* (2012) na placenta de ratas hipotireoideas aos 14 dias de gestação. A expressão de TLR-2 induz apoptose de células trofoblásticas (Koga *et al.*, 2009). Em contrapartida, a menor expressão do mRNA para TLR4 na placenta dos animais hipotireoideos pode ter resultado na menor

expressão gênica e/ou proteica de INF γ , IL-10 e iNOS, apresentada por eles. A expressão e ativação do TLR4 em células trofoblásticas induz a expressão e liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias (Koga *et al.*, 2009). Estes resultados demonstram que alterações na expressão dos TLRs podem ser resultantes não somente de processos infecciosos (Koga *et al.*, 2009), mas também de alterações no perfil endócrino de mulheres e animais gestantes.

Aos 14 dias de gestação, período em que há maior apoptose das células trofoblásticas em animais hipotireoideos (Silva *et al.*, 2012) acompanhado do aumento da expressão gênica de TLR2, observou-se redução da expressão gênica e/ou proteica de IL-10 e iNOS, que são citocinas anti-inflamatórias (Koga *et al.*, 2009). Alteração no perfil destas citocinas prejudica o ambiente feto-placentário (Toder *et al.*, 2003). Assim, durante o desenvolvimento fetal, o estabelecimento de um sistema imune placentário anti-inflamatório é fundamental para o sucesso da gestação (Coulam, 2000; Toder *et al.*, 2003). A redução da expressão de iNOS também favorece o estresse oxidativo na interface materno-fetal, uma importante causa de

aborto, de natimortalidade e de parto prematuro em mulheres (Rosario *et al.*, 2008). Vale ressaltar que as maiores concentrações plasmáticas de progesterona em ratas hipotireóides, observados por Hatsuta *et al.* (2004), podem também ter favorecido a menor expressão gênica de iNOS, uma vez que macrófagos de camundongos sob efeito de altas doses de progesterona apresentam redução da expressão de iNOS (Miller *et al.*, 1996).

A menor expressão gênica e proteica de INF γ observada nos animais hipotireóides pode também afetar o desenvolvimento fetoplacentário. O INF γ influencia diretamente a função das células *Natural Killer* uterinas que estão envolvidas na função imune placentária e na dinâmica vascular (Hu e Cross, 2010). Os animais hipotireóides apresentam alteração da vascularização placentária (Silva *et al.*, 2012). Além disso, o INF γ estimula a atividade fagocitária de macrófagos e de células gigantes trofoblásticas contra microorganismos (Ashkar *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). Assim, sugere-se que o hipotireoidismo pode facilitar a infecção do feto por patógenos e, com isso, o desenvolvimento de complicações gestacionais. Doenças metabólicas como a pré-eclâmpsia podem apresentar uma doença infecciosa como causa, sendo que 40% dos casos de parto prematuro em mulheres são resultantes de infecções intra-uterinas (Koga *et al.*, 2009).

O excesso de T4, diferente do hipotireoidismo, promoveu um ambiente anti-inflamatório aos 10 dias de gestação. Ele reduziu a expressão gênica de TNF α e MIF, que são citocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a expressão gênica de IL-10. Embora não se tenha observado alterações na expressão gênica dos receptores TLR2 e 4 no grupo tratado com tiroxina, são necessárias mais pesquisas que avaliem a expressão dos outros receptores TLRs. Eles

também são expressos pelas células trofoblásticas e podem estimular a liberação de citocinas inflamatórias (Koga *et al.*, 2009). A menor expressão de TNF α observada nos animais tratados com tiroxina pode ser resultante da menor expressão gênica de MIF. O MIF, direta ou indiretamente pelo seu receptor CD74, promove a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas do TNF α (Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Em contrapartida, o TNF α também induz a expressão de MIF em macrófagos através da ativação de TLRs (Calandra *et al.*, 1995; Todros *et al.*, 2005).

O aumento da expressão gênica e proteica de INF γ e MIF nos animais tratados com tiroxina, aos 19 dias de gestação, pode estar associado ao parto prematuro evidenciado em ratas com hipertireoidismo (Navas *et al.*, 2011). O parto é caracterizado por um influxo de células inflamatórias no miométrio (Koga *et al.*, 2009). Este ambiente pró-inflamatório promove a contração do útero, a expulsão do feto e a rejeição da placenta (Koga *et al.*, 2009). O parto também ocorre em um ambiente de hipóxia, sendo que a baixa tensão de oxigênio *in vitro* aumenta a expressão proteica e de mRNA de MIF em explantes de vilosidades coriônicas (Ietta *et al.*, 2007).

Conclui-se que o hipotireoidismo afeta a função imune materna por comprometer o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal. O hipotireoidismo experimental afeta a expressão gênica dos TLRs 2 e 4 e reduz a expressão gênica e/ou proteica de IL-10, iNOS e INF γ . O excesso de T4 experimental, pelo contrário, promove um ambiente anti-inflamatório no meio da gestação. Ele reduz a expressão gênica de TNF α e MIF e aumenta a expressão gênica de IL-10.

CAPÍTULO 3

Os fatores angiogênicos e hormonais placentários são afetados pelas disfunções tireoidianas maternas em ratas

Placental angiogenic and hormonal factors are affected by maternal thyroid dysfunction in rats

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica e proteica de fatores hormonais e angiogênicos na placenta de ratas com hipotireoidismo e excesso de T4. Setenta e duas ratas adultas foram divididas igualmente nos grupos hipotireoideo, tratado com L-tiroxina e controle. O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil. Os animais foram eutanasiados com 10, 14 e 19 dias de gestação. Avaliou-se a expressão imunistoquímica de VEGF e seu receptor Flk-1. A expressão gênica de VEGF, Flk-1, PGF, sFlt-1, PL-1 e rPlf foi avaliada nos discos placentários pelo RT-PCR tempo real. Os dados foram analisados pelo teste SNK. No dia 10, o excesso de T4 aumentou a expressão gênica de VEGF e PGF, enquanto o hipotireoidismo aumentou a expressão gênica de rPlf. Ambas as condições reduziram a expressão gênica de Flk-1 e PL-1 no dia 10. No dia 14, o hipotireoidismo reduziu o VEGF, PGF e a expressão gênica de rPlf. O hipotireoidismo reduziu a imunomarcagem de VEGF no labirinto placentário aos 14 e 19 dias de gestação, mas aumentou a sua expressão na camada do espongiotrofoblasto no dia 14. O hipotireoidismo também aumentou a expressão de Flk-1 aos 14 dias de gestação. Nos dias 14 e 19, o excesso de T4 aumentou a expressão gênica de PL-1 e reduziu a imunomarcagem de VEGF. O excesso de T4 também reduziu a expressão de Flk-1 e sFlt-1 no dia 19. Tanto o hipotireoidismo quanto o excesso de T4 aumentaram a expressão gênica de rPlf no dia 19. Conclui-se que o hipotireoidismo e o excesso de T4 têm efeitos diferenciados sobre a expressão de fatores envolvidos na atividade angiogênica e hormonal da placenta e estes efeitos são dependentes do período gestacional.

Palavras-chave: disfunção tireoidiana, placenta, trofoblasto, angiogênese, hormônio, rata

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the gene transcription and immunohistochemical expression of hormonal and angiogenic factors of the placentas in hypothyroid and L-thyroxine (T4)-treated rats. Seventy-two adult female rats were divided equally into hypothyroid, T4-treated, and control groups. Hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil. The animals were sacrificed at 10, 14, and 19 days of gestation. We evaluated the immunohistochemical expression of VEGF and its receptor Flk-1. The gene transcription of VEGF, Flk-1, PGF, sFlt1, PL-1, and rPlf was evaluated in placental discs by real-time RT-PCR. The data were analyzed using an SNK test. At day 10, excess of T4 increased VEGF and PGF gene expression, while hypothyroidism increased rPlf gene expression. Both conditions reduced Flk-1 and PL-1 gene expression at day 10. At day 14, hypothyroidism reduced VEGF, PGF, and rPlf gene expression. Hypothyroidism reduced VEGF immunostaining in the placental labyrinth at 14 and 19 days of gestation but increased its immunostaining in the spongiotrophoblast layer at day 14. Hypothyroidism increased also Flk-1 expression at 14 days of gestation. At days 14 and 19, excess of T4 increased PL-1 gene expression and reduced VEGF immunostaining. Excess of T4 also reduced Flk-1 and sFlt-1 expression at day 19. Both hypothyroidism and excess of T4 increased rPlf gene expression at day 19. In conclusion, hypothyroidism and excess of T4 have differential effects on the expression of factors involved in placental angiogenic and hormonal activity, and these effects are dependent on the gestational period.

Keywords: thyroid dysfunction, trophoblast, placenta, angiogenesis, hormone, rat

INTRODUÇÃO

A principal função da placenta é a troca de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (Malassiné *et al.*, 2003), de modo que alterações no desenvolvimento vascular placentário como também na produção de hormônios pela placenta estão associadas a complicações gestacionais como o aborto espontâneo, a pré-eclâmpsia e o retardo do crescimento fetal intra-uterino (Malassiné *et al.*, 2003; Torry *et al.*, 2004; Redmer *et al.*, 2005; Vonnahme *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2010). Sendo assim, várias pesquisas nesta área têm sido realizadas (Redmer *et al.*, 2005; Vonnahme *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2010). Contudo, embora o hipo e o hipertireoidismo em humanos e animais afete a gestação e cause aborto (Poppe e Glinóer, 2003; Stagnaro-Green, 2011), pouco se sabe sobre a influência das disfunções tireoidianas na angiogênese e no perfil endócrino placentário (Maruo *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2012).

A angiogênese placentária ocorre desde a implantação e decidualização até a formação definitiva da placenta (Reynolds *et al.*, 2010). A ocorrência de aborto espontâneo e de pré-eclâmpsia em mulheres têm sido associada à alterações na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e/ou seu receptor Flk-1 e, conseqüentemente, à alterações no desenvolvimento vascular da placenta (Redmer *et al.*, 2005; Vonnahme *et al.*, 2008). Além do VEGF, o fator de crescimento placentário (PGF) é outro fator pró-angiogênico amplamente expresso na placenta humana e dos animais domésticos, podendo ser um mediador autócrino da função trofoblástica (Sherer e Abulafia, 2001; Plaisier *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Seidenspinner *et al.*, 2011). Falhas na sua expressão também têm sido associadas à ocorrência de pré-eclâmpsia em mulheres (Thadhani *et al.*, 2004). O equilíbrio na expressão desses fatores angiogênicos no decorrer da gestação é fundamental para o adequado desenvolvimento feto-placentário (Plaisier *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008). Sabe-se que ratas hipotireóideas apresentam redução de vasos fetais e dilatação do seio vascular materno no labirinto placentário aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente (Silva *et al.*, 2012). Uma hipótese deste estudo é de que essas alterações vasculares observadas na placenta de

ratas com hipofunção tireoidiana sejam resultantes de alteração na expressão placentária de VEGF e PGF.

O hipotireoidismo também causa redução do peso fetal e placentário em ratas (Silva *et al.*, 2012), diferente de ratas com hipertireoidismo que apresentam maior taxa de gestação sem alteração do peso e da viabilidade fetal (Freitas *et al.*, 2007). O adequado desenvolvimento feto-placentário depende não somente de uma vascularização placentária adequada como também da produção de hormônios pela própria placenta (Malassiné *et al.*, 2003). Entre estes hormônios, produzidos pelas células trofoblásticas, encontram-se o lactogênio placentário 1 (PL-1) e a proteína relacionada ao proliferin (rPlr). O PL-1 é importante para o metabolismo fetal e materno uma vez que estimula a secreção de insulina durante a gestação (Cross *et al.*, 2002; Cross, 2005). Já a rPlf inibe a migração de células endoteliais e a neovascularização placentária (Jackson *et al.*, 1994). Outra hipótese deste estudo é que as alterações placentárias e fetais observadas no hipo e hipertireoidismo possam ser resultantes de alterações na expressão placentária de PL-1 e rPlf.

Assim, pelo fato de haver poucas informações sobre o impacto das disfunções tireoidianas maternas no perfil angiogênico e endócrino placentário, estudar o efeito do hipotireoidismo e do excesso de T4 na expressão gênica e proteica de fatores angiogênicos e hormonais na placenta é importante e foi o objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 268/2011) (ANEXO 1).

Indução das disfunções tireoidianas e acasalamento

Setenta e duas ratas Wistar adultas foram usadas neste estudo (Figura 1). Os animais foram alojados em caixas plásticas com seis ratas/caixa no regime de 12hs de luz e 12hs de escuro. As ratas foram alimentadas com ração comercial

contendo 22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio e 0,6% de fósforo. Alimento e água foram

fornechos *ad libitum*.

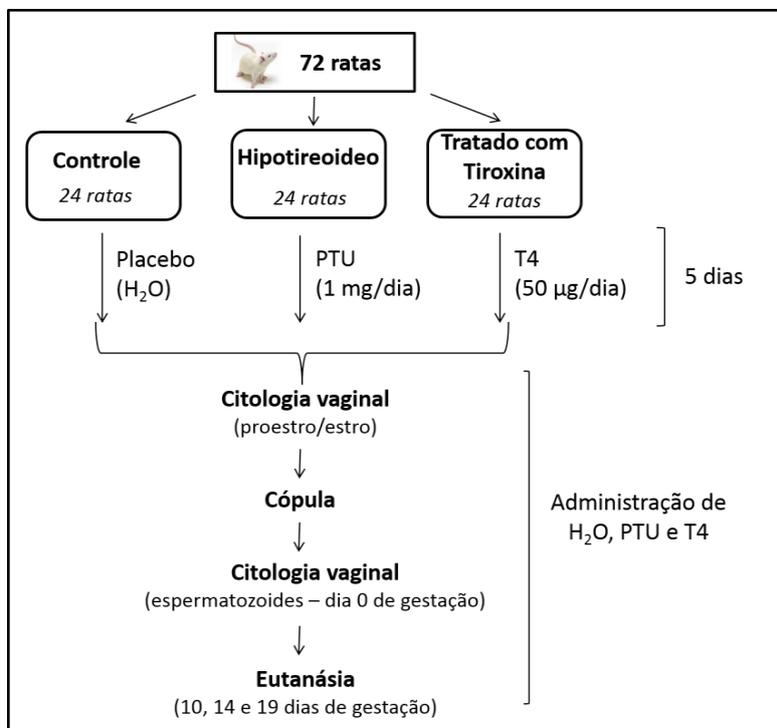


Figura 1. Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.

Depois de um período de adaptação de sete dias, as ratas foram divididas aleatoriamente em três grupos (controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina), com 24 animais por grupo.

O hipotireoidismo foi induzido pela administração de propiltiouracil (PTU)²⁹ diluído em 5 mL de água destilada, de acordo com Silva *et al.* (2004), utilizando uma sonda orogástrica (1mg/animal/dia). As ratas tratadas com tiroxina receberam L-tiroxina (T4)³⁰ diluída em 5 mL de água destilada, como descrito por Serakides *et al.* (2001), utilizando uma sonda orogástrica (50µg/animal/dia). As ratas do grupo controle receberam 5 ml de água destilada, por dia, como placebo.

Cinco dias após o início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral. As ratas em proestro e estro foram mantidas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 h. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram obtidos para detectar espermatozoides. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, e esse dia foi considerado dia 0 de gestação. Neste período, seis ratas de cada grupo também foram eutanasiadas com uma overdose de anestésico³¹ para coleta de sangue, dosagem de T3 e T4 livre e confirmação da indução da disfunção tireoidiana. Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas. Os animais dos grupos hipotireoideo, tratado com tiroxina e controle continuaram a receber PTU, T4 e água,

²⁹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

³⁰ Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

³¹ 2,5% Tionembutal; ABBOTT, São Paulo, Brasil

respectivamente, por sonda orogástrica, durante todo o período experimental.

Análise hormonal

Aos 0, 10, 14 e 19 dias de gestação, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com overdose de anestésico. Aos 0 e 19 dias de gestação, o sangue foi colhido com anti-coagulante (heparina) das ratas e o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C para a dosagem de T3 e T4 livre, a qual foi realizada usando a técnica de ELISA de quimiluminescência (sensibilidade: 0,4 ng/dl), com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante³².

Necropsia e coleta de material

Na necropsia, o útero foi colhido juntamente com a placenta e os fetos. Seis discos placentários com a decídua e glândula metrial/rata foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Para a realização da imunoistoquímica e análise morfológica, secções histológicas (4µm) dos discos placentários junto com a decídua e glândula metrial foram obtidas em lâminas silanizadas.

Três discos placentários sem decídua por rata também foram dissecados, congelados em nitrogênio líquido por 24 horas e armazenados a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica de VEGF, Flk-1 (receptor do VEGF), PGF, sFlt-1, PL-1 e rPLf utilizando RT-PCR em tempo real. Os discos placentários eram formados unicamente pelo sinciciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário.

Imunoistoquímica

Para imunoistoquímica dos discos placentários os anticorpos utilizados e suas diluições foram: anti-VEGF³³ (1:100) e anti-Flk-1³⁴ (1:100). Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase³⁵ e a recuperação antigênica foi

realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando solução Retrieval. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro bloqueio³⁶ e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina³⁷. As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris³⁸. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

A intensidade e área de imunomarcção de VEGF e Flk-1 foram avaliadas na camada do espongiotrofoblasto e no labirinto placentário aos 14 e 19 dias de gestação. O sinciciotrofoblasto não foi avaliado pelo fato da sua espessura não ser uniforme ao longo do disco placentário e por não possibilitar a aquisição de uma área padrão (mesma área) em todas as lâminas para a avaliação morfométrica. A avaliação da imunoistoquímica não foi realizada aos 10 dias de gestação pois as camadas da placenta ainda não estão definidas na rata neste período gestacional.

Para determinar a intensidade de imunomarcção e área marcada, imagens de seis e oito campos aleatórios/cada camada aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente, foram fotografadas com um microscópio Olympus BX-40 acoplado a uma câmera digital Spot Color Vision³⁹, e a intensidade da imunomarcção e área marcada foram determinadas utilizando o software ImageJ WCIF^{®40}. *Color deconvolution* e *thresholding* foram realizadas nas imagens. Para assegurar a objetividade do processo, uma média foi obtida a partir da avaliação de três discos placentários por animal. Os dados de cada disco placentário foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada (intensidade) e área marcada em pixels.

O número de campos avaliados em cada camada da placenta foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou

³² IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA

³³ sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

³⁴ sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

³⁵ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA

³⁶ Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

³⁷ DAB, Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

³⁸ Hematoxilina de Harris, Merck, Darmstadt, DE

³⁹ SPOTTM, Sterling Heights, Michigan, EUA

⁴⁰ Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA

(Sampaio et al., 2007). Em uma lâmina de imunistoquímica da placenta do grupo controle foram determinadas a área e a intensidade de imunomarcção em pixels em 10 e 15 campos para a camada do espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. A seguir, foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação de cada variável estudada em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 campos, dependendo da camada da placenta. Após verificar que o coeficiente de variação se estabilizava (não apresenta diferença maior que 10%) em 6 e 8 campos para o espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente, este valor foi adotado para se determinar a área e intensidade de imunomarcção média de cada camada da placenta.

RT-PCR em tempo real

O mRNA total dos discos placentários foi extraído usando o reagente Trizol⁴¹ de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 1µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *Platinum SuperScript III qPCR Two-Step com SYBR Green*⁴². As reações de RT-PCR foram realizadas em um termociclador *Smart Cycler II*⁴³. A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde os valores das amostras foram calculados e calibrados em relação aos valores do CT de β -actina. Os primers estão na Tabela 1. A avaliação da expressão gênica foi realizada aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 3X3 (três grupos; três períodos gestacionais) e os valores médios com o desvio padrão dos grupos experimentais foram determinados e foi realizada análise de variância (ANOVA). O teste de *Student Newman Keuls* (SNK) foi utilizado para comparar as médias dos grupos hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação ao controle. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

⁴¹ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

⁴² Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

⁴³ Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, EUA

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.

Genes	Primers	Número de acesso
VEGF	forward 5'- GCCCAGACGGGGTGGAGAGT -3' reverse 5'- AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA -3'	NM_001110336.1
Flk-1	forward 5'- GTCCGCCGACACTGCTGCAA -3' reverse 5'- CTCGCGCTGGCACAGATGCT -3'	NM_013062.1
PGF	forward 5'- CCGGCCCTGGCTGCATTGAA -3' reverse 5'- CAGGCAAAGCCACAGGCCA -3'	NM_053595.2
sFlt-1	forward 5'- CGGACGCGAGACTGGGAGGA -3' reverse 5'- CGCCGCGAGAGCTCTTCTCG -3	NM_019306.1
PL-1	forward 5'- CCTGGCTGGGAGCCTACACTGT -3' reverse 5'- TGGCAGTTGGTTTGGAGGCCA -3'	NM_001083940.2
rPlf	forward 5'- CCTCGAGCCAAGAATTCCGGCA -3' reverse 5'- GGAGAGCCCCTGAGGAGCAAGA -3'	NM_053364.1
β -actin	forward 5'- TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT -3' reverse 5'- CGACGAGCGCAGCGATATCGT -3'	NM_031144.2

RESULTADOS

Indução das disfunções tireoidianas

A indução do hipotireoidismo e excesso de T4 ao longo de todo o período gestacional foi confirmado pela concentração plasmática de T3 e T4 livre aos 0 e 19 dias de gestação, bem como pelos sinais clínicos apresentados pelos animais.

As ratas tratadas com PTU apresentaram menores concentrações de T3 e T4 livre em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 2) e sinais clínicos de letargia e alopecia. As ratas tratadas com tiroxina exibiram maiores concentrações de T4 livre comparado aos animais controle ($P < 0,05$) (Figura 2) e apresentaram sinais clínicos caracterizados por agressividade e exoftalmia.

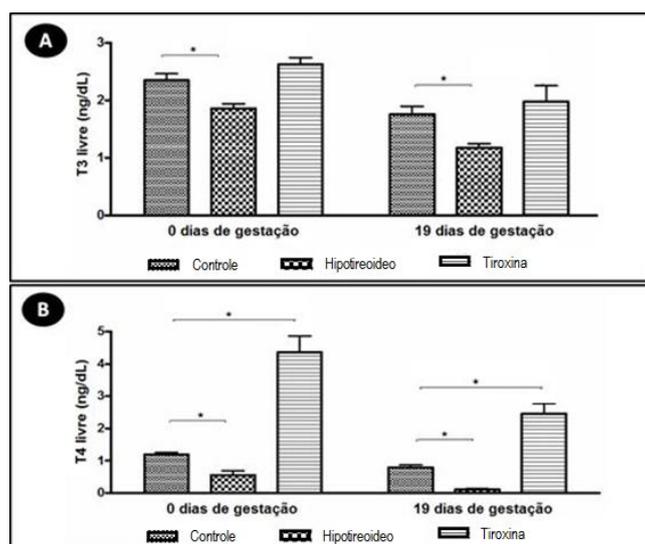


Figura 2. Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação. (* $P < 0,05$)

Expressão imunoistoquímica de VEGF e Flk-1

Independentemente do grupo experimental, a placenta apresentou expressão de VEGF e Flk-1 nas três camadas (sinciciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário) aos 14 e 19 dias de gestação. A expressão imunoistoquímica de VEGF foi nuclear e/ou citoplasmática, ao contrário da expressão de Flk-1 que foi apenas citoplasmática, com uma expressão mais intensa aos 14 dias de gestação em relação aos 19 dias de gestação (Figuras 3 e 4). O sinciciotrofoblasto apresentava expressão de VEGF e Flk-1 em algumas células trofoblásticas. O espongiotrofoblasto mostrou expressão heterogênea de VEGF e Flk-1 entre as células aos 14 e 19 dias de gestação. A expressão de VEGF foi maior nas células de glicogênio comparado com os espongiotrofoblastos nos três grupos experimentais. A expressão de Flk-1, pelo contrário, foi maior nos espongiotrofoblastos comparado com as células de glicogênio. No labirinto placentário de todos os grupos, a expressão de VEGF e Flk-1 foi uniforme nas células trofoblásticas que delimitavam os seios vasculares.

O grupo hipotireoideo mostrou um aumento da área de imunomarcagem de VEGF na camada do espongiotrofoblasto em comparação ao grupo controle aos 14 dias de gestação, mas isto não foi observado aos 19 dias de gestação. Em vez disso, aos 19 dias de gestação, uma redução na área e intensidade de expressão de VEGF na camada do espongiotrofoblasto foi observada nos animais hipotireoideos em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 3). No labirinto placentário, aos 14 e 19 dias de gestação, o hipotireoidismo reduziu a área e intensidade da expressão imunoistoquímica de VEGF em relação às ratas controle ($P < 0,05$). As ratas com excesso de T4 mostraram uma redução da área e intensidade de expressão imunoistoquímica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto aos 14 e 19 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 3).

Em relação à expressão do Flk-1, receptor do VEGF, o hipotireoidismo aumentou a área e intensidade de expressão imunoistoquímica na camada do espongiotrofoblasto aos 14 dias de gestação em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). No labirinto placentário, aos 14 e 19 dias de gestação, não houve diferença na expressão

imunoistoquímica de Flk-1 entre os grupos experimentais ($P > 0,05$) (Figura 4).

Expressão gênica dos fatores pró-angiogênicos VEGF, Flk-1 e PGF

No decorrer da gestação, a expressão gênica de VEGF nos grupos controle e hipotireoideo aumentou aos 14 dias de gestação, mas diminuiu no dia 19, diferente dos animais tratados com tiroxina que exibiram maior expressão gênica de VEGF aos 19 dias de gestação comparado com os outros períodos gestacionais avaliados. Aos 14 dias de gestação, os discos placentários dos animais hipotireoideos mostraram uma redução na expressão de mRNA para VEGF em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 5A). Isto foi diferente dos animais tratados com tiroxina que exibiram um aumento da expressão gênica de VEGF em comparação com o grupo controle aos 10 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 5A).

A expressão gênica de Flk-1 nos grupos controle e hipotireoideo foi similar à expressão gênica de VEGF no transcorrer da gestação, diferente do grupo tratado com tiroxina que exibiu menor expressão gênica de Flk-1, aos 19 dias de gestação, comparado com os outros períodos gestacionais avaliados. Aos 10 dias de gestação, o grupo hipotireoideo mostrou uma redução da expressão gênica de Flk-1 em relação às ratas controle ($P < 0,05$), diferente dos 14 dias de gestação. Em vez disso, aos 14 dias de gestação, foi observado um aumento da expressão gênica de Flk-1 nos animais com hipotireoidismo em comparação com o grupo controle (Figura 5B). O grupo tratado com tiroxina mostrou uma redução da expressão de mRNA para Flk-1 aos 10 e 19 dias de gestação comparado com o grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 5B).

Nos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina a expressão gênica de PGF diminuiu no decorrer da gestação. O hipotireoidismo mostrou redução da expressão de mRNA para PGF aos 14 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$), ao contrário dos animais com excesso de T4 que exibiram uma maior expressão gênica de PGF aos 10 dias de gestação em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 5C).

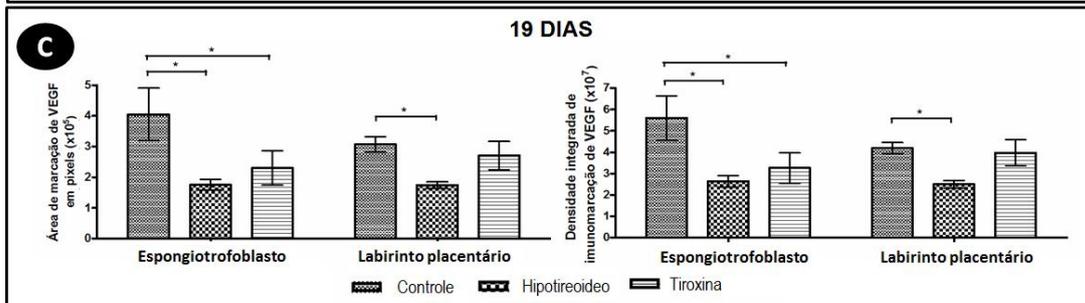
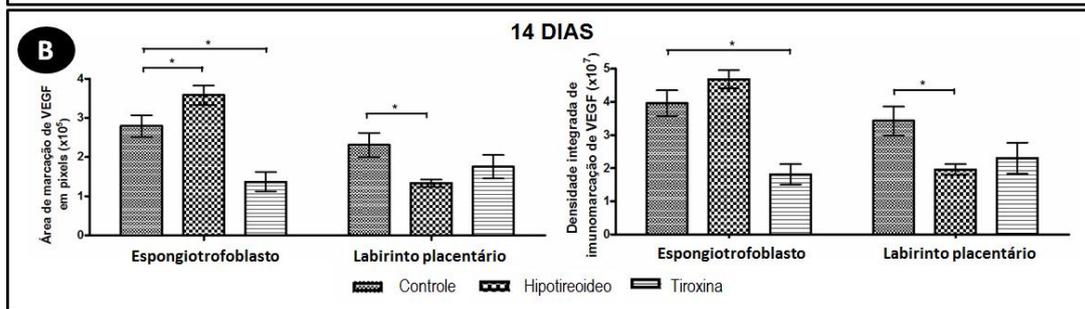
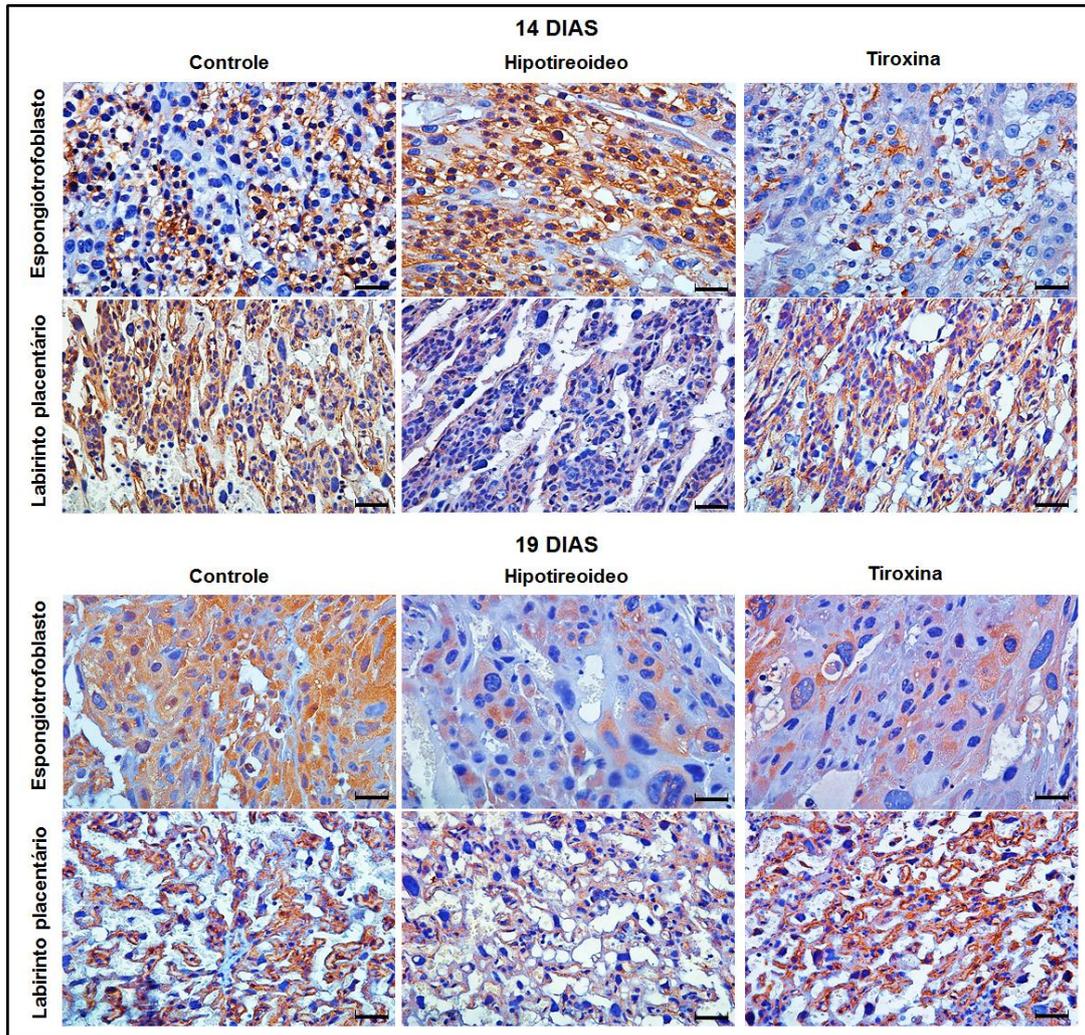


Figura 3. Expressão de VEGF na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 14 e 19 dias de gestação. A) A) Imagens imunistoquímicas da expressão de VEGF (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm). B e C) Aumento da área de expressão de VEGF na camada do espongiotrofoblasto no grupo hipotireoideo em comparação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. Redução da área e intensidade de expressão imunistoquímica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto nos animais com hipotireoidismo em relação ao grupo controle aos 19 dias de gestação. Redução da área e intensidade de expressão imunistoquímica de VEGF no labirinto placentário dos animais com hipotireoidismo em comparação às ratas controle. Ratas tratadas com tiroxina com redução da área e intensidade de expressão imunistoquímica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto aos 14 e 19 dias de gestação em comparação com as ratas controle. (*P<0,05)

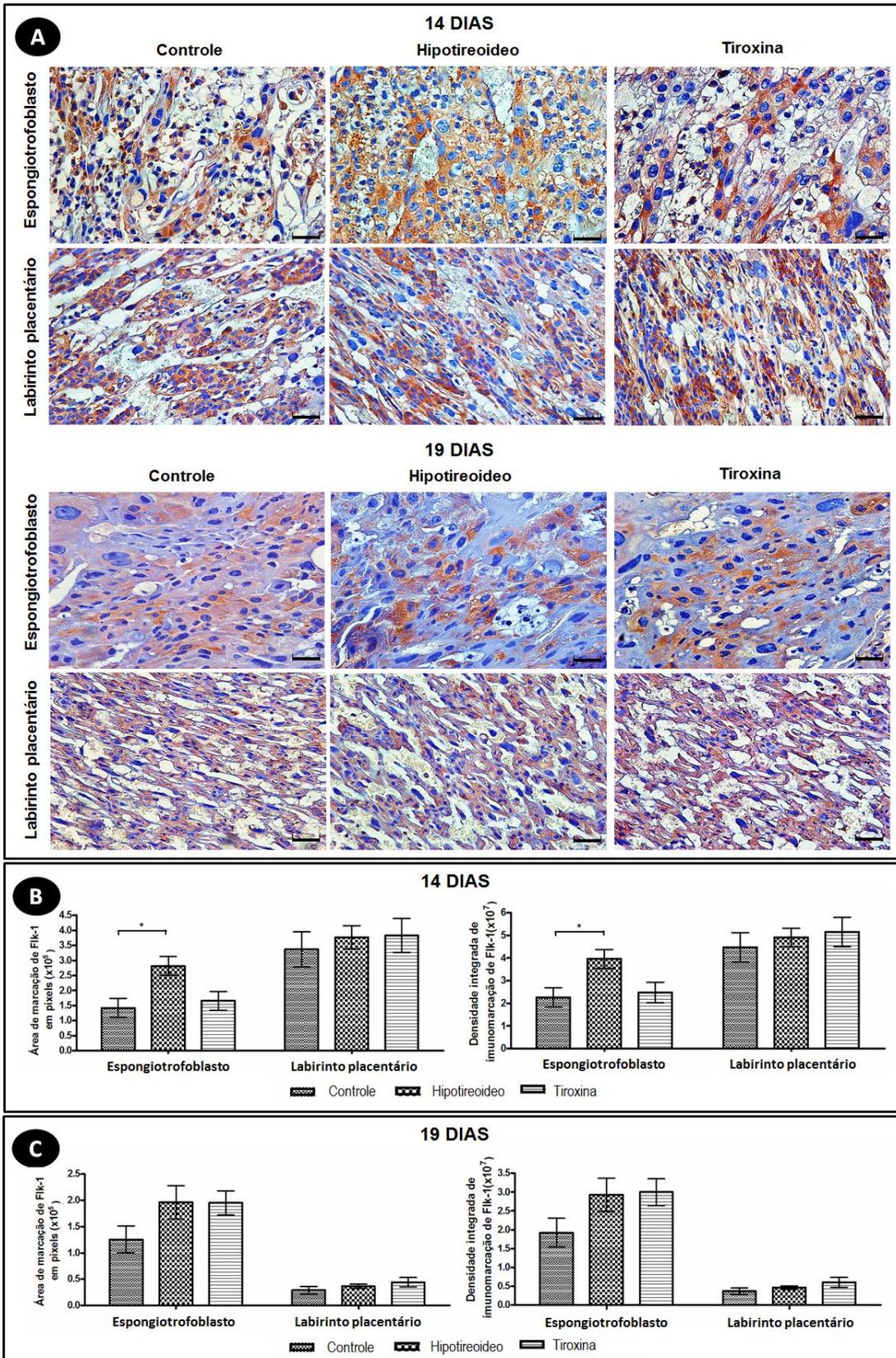


Figura 4. Expressão de Flk-1 na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 e 19 dias de gestação. A) Imagens imunistoquímicas da expressão de Flk-1 (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, barra = 12µm.) B e C) Aumento da área e intensidade de expressão de Flk-1 na camada do espongiotrofoblasto do grupo hipotireoideo em comparação ao grupo controle aos 14 dias de gestação. (*P<0,05)

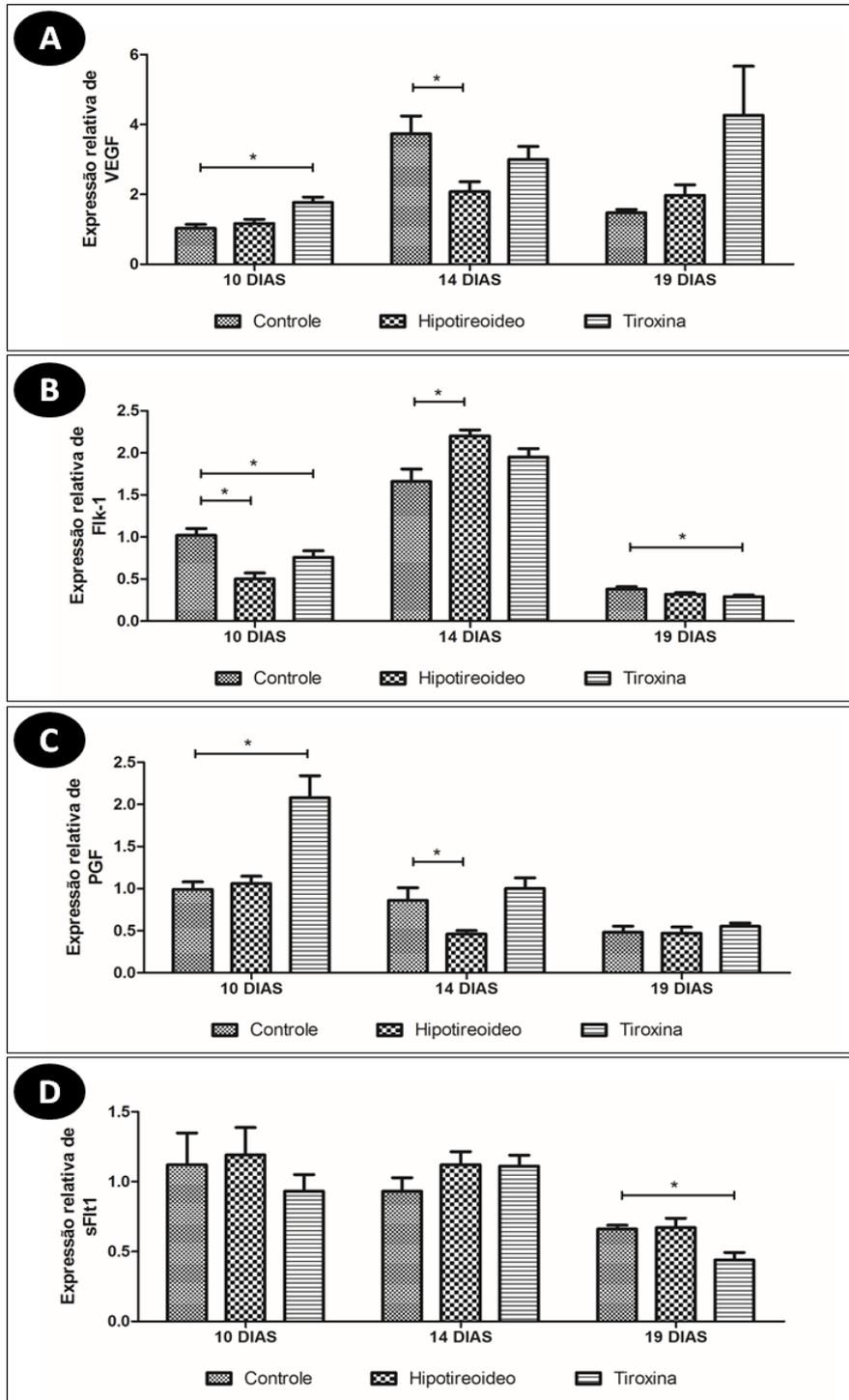


Figura 5. A-D) Expressão relativa de transcritos gênicos para VEGF(A), Flk-1 (B), PGF (C) e sFlt-1 (D) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 10, 14 e 19 dias de gestação (*P<0,05)

Expressão gênica do fator anti-angiogênico sFlt-1

Durante a gestação, a expressão gênica de sFlt-1 nos três grupos experimentais diminuiu somente aos 19 dias de gestação. Contudo, aos 19 dias de gestação, os discos placentários dos animais tratados com tiroxina mostraram menor expressão de mRNA para sFlt-1 em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 5D). As ratas hipotireoideas não apresentaram diferenças na expressão gênica para sFlt-1 em relação às ratas controle em qualquer um dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$) (Figura 5D).

Expressão gênica dos hormônios PL-1 e rPlf

No decorrer da gestação, a expressão gênica de PL-1 nos grupos controle, hipotireoide e tratado com tiroxina foi menor no dia 14 e maior aos 19 dias de gestação. O hipotireoidismo diminuiu a expressão gênica de PL-1 aos 10 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($p < 0,05$), ao contrário dos animais com excesso de T4 que mostraram um aumento na expressão do mRNA para PL-1 em comparação com o grupo controle aos 14 e 19 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 6A). O grupo tratado com tiroxina também mostrou uma redução na expressão gênica para PL-1 aos 10 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($p > 0,05$) (Figura 6A).

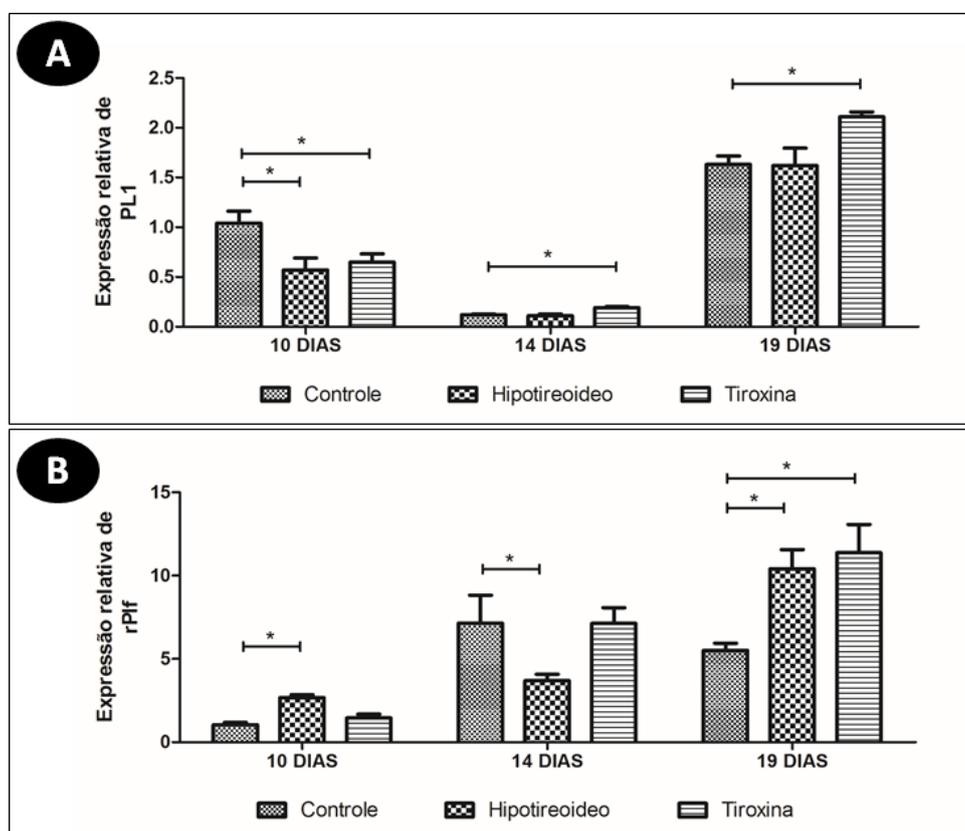


Figura 6. A e B) Expressão relativa de transcritos gênicos para PL-1(A) e rPlf (B) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratado com tiroxina com 10, 14 e 19 dias de gestação (* $P < 0,05$).

A expressão gênica de rPlf aumentou nos três grupos experimentais com o avançar da gestação. Contudo, os animais hipotireoideos mostraram um aumento na expressão de mRNA para rPlf aos 10 e 19 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$), mas isto não foi

observado aos 14 dias de gestação. Aos 14 dias de gestação, uma redução na expressão gênica de rPlf foi observada nos animais com hipotireoidismo em comparação com as ratas controle ($P < 0,05$). O grupo tratado com tiroxina mostrou um aumento na expressão gênica para

rPlf aos 19 dias de gestação em comparação com as ratas controle ($p < 0,05$) (Figura 6B).

Em resumo, as ratas hipotireoideas e tratadas com tiroxina apresentaram variações na

expressão gênica e/ou proteica de fatores angiogênicos e hormonais na placenta em relação às ratas controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos do hipotireoidismo e excesso de T4 na expressão de fatores angiogênicos e hormonais na placenta de ratas em relação ao grupo controle.

Fatores angiogênicos	Hipotireoidismo			Excesso de T4		
	10 dias	14 dias	19 dias	10 dias	14 dias	19 dias
VEGF	-	↓	-	↑	-	-
Flk-1	↓	↑	-	↓	-	↓
PGF	-	↓	-	↑	-	-
sFlt-1	-	-	-	-	-	↓
Expressão imunoistoquímica						
	14 dias		19 dias		19 dias	
	EP	LP	EP	LP	EP	LP
VEGF	↑	↓	↓	↓	↓	-
Flk-1	↑	-	-	-	-	-
Expressão gênica						
Hormônios	10 dias	14 dias	19 dias	10 dias	14 dias	19 dias
PL-1	-	↓	-	↑	-	↑
rPlf	-	↓	-	-	-	-

DISCUSSÃO

As disfunções tireoidianas de origem materna afetam a expressão de fatores angiogênicos e hormonais envolvidos no desenvolvimento e na função placentária, sendo este efeito dependente do período gestacional.

Aos 10 dias de gestação, as ratas tratadas com T4 apresentaram aumento na expressão gênica para VEGF e PGF, que são considerados os principais fatores pró-angiogênicos envolvidos no desenvolvimento vascular da interface materno-fetal (Vuorela *et al.*, 1997; Smith, 2000; Plaisier *et al.*, 2007). Em contrapartida, o hipotireoidismo reduziu a expressão gênica para Flk-1 e PL-1 e aumentou a expressão de mRNA para rPlf. O rPlf é considerado um fator anti-angiogênico por inibir a migração de células endoteliais e a neovascularização placentária (Jackson *et al.*, 1994; Toft e Linzer, 2000; Corbacho *et al.*, 2002). O aumento de VEGF e de PGF na placenta de ratas tratadas com T4 no terço médio da gestação pode favorecer um maior aporte hematotrófico para o feto, uma vez que esses fatores promovem neovascularização e aumento da permeabilidade vascular (Reynolds *et al.*,

2010). Ratas com excesso de T4 apresentam aumento da taxa de ovulação (Serakides *et al.*, 2001) e de gestação (Freitas *et al.*, 2007). É provável que o aumento da expressão desses fatores angiogênicos permita que a placenta contribua diretamente para o aumento da taxa de gestação no hipertireoidismo (Rosato *et al.*, 1998).

Contudo, aos 10 dias de gestação, o excesso de T4 reduziu a expressão gênica de Flk-1 e PL-1. Mais pesquisas avaliando a expressão proteica desses fatores são necessárias para verificar se as alterações observadas na expressão deles poderiam estar envolvidas nos casos de aborto que ocorrem em mulheres hipertireoideas no terço inicial da gestação (Stagnaro-Green, 2011). A avaliação da imunoexpressão aos 10 dias de gestação dos fatores estudados não foi possível de ser realizada uma vez que as camadas da placenta ainda não estão bem definidas.

Aos 14 dias de gestação, o hipotireoidismo reduziu a expressão proteica e gênica de VEGF e a expressão gênica de PGF. Este resultado pode justificar, pelo menos em parte, a redução dos capilares fetais no labirinto placentário de ratas

com hipotireoidismo aos 14 dias de gestação (Silva *et al.*, 2012). Houve oscilação na expressão de rPlf na placenta de ratas com hipotireoidismo, havendo aumento aos 10 dias e redução ao 14 dias. O papel anti-angiogênico do rPlf no desenvolvimento placentário ainda é pouco estudado (Toft e Linzer, 2000; Corbacho *et al.*, 2002), mas sabe-se que ele apresenta maior ação biológica na segunda metade da gestação (Toft e Linzer, 2000; Corbacho *et al.*, 2002). Como a placenta definitiva da rata se estabelece por volta dos 10 dias (Cross, 2000), é provável que o aumento da expressão de rPlf aos 10 dias já possa ter contribuído negativamente para a alteração vascular placentária observada nestas ratas (Silva *et al.*, 2012). Outro ponto importante é que a oscilação na expressão de fatores angiogênicos ao longo da gestação pode ser danosa uma vez que, o equilíbrio na expressão de fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos no decorrer da gestação é fundamental para o desenvolvimento feto-placentário adequado (Plaisier *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008). Além disso, em condições normais, o aumento do fluxo sanguíneo placentário deve ocorrer a partir do 12º dia de gestação na rata para possibilitar um desenvolvimento feto-placentário adequado e evitar a exposição inadequada do feto aos efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (Correia-da-Silva *et al.*, 2004; Burton, 2009). Assim, acredita-se que as alterações observadas na expressão de VEGF, PGF e de rPlf na placenta de ratas hipotireoideas do presente estudo possam corroborar com a restrição de crescimento intra-uterino, natimortalidade e aborto observados em mulheres e animais com hipotireoidismo (Poppe e Glinioer, 2003; Stagnaro-Green, 2011; Silva *et al.*, 2012).

A redução da expressão gênica de VEGF na placenta das ratas hipotireoideas aos 14 dias de gestação resultou das alterações observadas no labirinto placentário, uma vez que o mesmo apresentou redução da imunomarcagem de VEGF, diferente da camada do espongiotrofoblasto que apresentou aumento da imunomarcagem. É importante ressaltar que o labirinto placentário compõe a maior parte do disco placentário (Cross, 2005). Desta forma, o aumento da imunomarcagem de VEGF no espongiotrofoblasto não impediu que houvesse redução da expressão gênica de VEGF no disco

placentário. Estas observações demonstram a importância da utilização da imunistoquímica, uma vez que essa técnica permite associar a imunomarcagem à morfologia do tecido.

Contudo, além do aumento da imunomarcagem de VEGF na camada do espongiotrofoblasto, os animais hipotireoideos também apresentaram aumento da expressão proteica e gênica para Flk-1 aos 14 dias de gestação. A expressão de Flk-1 é auto-regulada e estimulada pelo VEGF (Andraweera *et al.*, 2012). Sugere-se que o aumento observado na expressão de VEGF e de Flk-1 na camada do espongiotrofoblasto dos animais hipotireoideos aos 14 dias de gestação tenham duas possíveis explicações. Primeiro, ele pode ser resultante do aumento da população de células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto observado nestes animais aos 14 dias de gestação (Silva *et al.*, 2012), uma vez que as células de glicogênio apresentam expressão imunistoquímica para VEGF mais intensa que as células citotrofoblásticas (Silva *et al.*, 2012). Segundo, ratas hipotireoideas apresentam redução na expressão gênica de leptina placentária neste mesmo período gestacional (Silva *et al.*, 2014). A leptina placentária é produzida no espongiotrofoblasto e influencia a atividade angiogênica placentária inibindo a expressão de VEGF (Gambino *et al.*, 2010; Gambino *et al.*, 2012). A camada do espongiotrofoblasto é a principal região na placenta da rata onde ocorre a produção dos fatores angiogênicos (Voss *et al.*, 2000; Maynard *et al.*, 2003; Plaisier *et al.*, 2009). Entretanto, o aumento na expressão de VEGF no espongiotrofoblasto de ratas hipotireoideas pode ser insuficiente para permitir o desenvolvimento vascular adequado do labirinto placentário, como demonstrado em pesquisas realizadas anteriormente (Silva *et al.*, 2012), em decorrência das alterações negativas observadas na expressão de fatores angiogênicos pelo próprio labirinto placentário.

Aos 19 dias de gestação, as ratas tratadas com T4 apresentaram aumento da expressão gênica para PL-1, similar ao que observou-se aos 14 dias de gestação. Este aumento na expressão de PL-1 no terço final da gestação pode contribuir para o aumento da taxa de gestação (Freitas *et al.*, 2007). O PL-1 influencia o metabolismo materno e fetal, pois estimula a secreção de insulina durante a gestação (Sorenson e Brelje, 1997;

Cross *et al.*, 2002; Cross, 2005). A insulina é fundamental para o desenvolvimento fetal, pois proporciona maior quantidade de glicose e de nutrientes para o feto em desenvolvimento (Inhasz *et al.*, 2013). Vale lembrar que ratas hipotireóideas apresentam redução do peso fetal e placentário (Silva *et al.*, 2012), e que aos 10 dias de gestação elas apresentaram redução da expressão gênica para PL-1. Além disso, aos 19 dias de gestação, as ratas hipotireóideas apresentaram redução da expressão proteica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto e do labirinto placentário, como também aumento na expressão gênica de rPlf. A alteração desses fatores pode ser a causa da redução dos vasos fetais e dilatação do seio vascular materno observado no labirinto placentário de animais com hipotireoidismo aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente (Silva *et al.*, 2012).

Entretanto, aos 19 dias de gestação, o grupo tratado com tiroxina apresentou redução na expressão proteica de VEGF na camada do espongiotrofoblasto, além de redução da expressão gênica para Flk-1 e sFlt-1. Neste

mesmo período gestacional, também ocorreu aumento da expressão de mRNA para rPlf. Sugere-se que a redução na expressão de VEGF e Flk-1 seja resultante do aumento da expressão de rPlf devido à sua ação anti-angiogênica (Jackson *et al.*, 1994; Maynard *et al.*, 2003; Plaisier *et al.*, 2009). Sabe-se que, em condições normais, a expressão de VEGF e de Flk-1 em mulheres é mais intensa no início da gestação e diminui com o avançar dela (Jackson *et al.*, 1994). Contudo, se ao final da gestação, houver redução do VEGF para limites inferiores ao fisiológico, pode haver parto prematuro em mulheres (Kramer *et al.*, 2005; Andraweera *et al.*, 2012). Nossa hipótese é que a redução de VEGF e Flk-1 em ratas com excesso de T4 ao final da gestação possa estar envolvida na gênese do parto prematuro já descrito em ratas hipertireóideas (Navas *et al.*, 2011).

Conclui-se que a disfunção tireoidiana materna afeta de forma diferenciada a expressão proteica e/ou gênica de fatores envolvidos na atividade angiogênica e hormonal placentária, sendo estes efeitos dependentes do período gestacional.

CAPÍTULO 4

A cinética de migração trofoblástica intrauterina é afetada pelas disfunções tireoidianas maternas em ratas

Intrauterine trophoblast migration kinetics is affected by maternal thyroid dysfunctions in rats

RESUMO

A migração de células trofoblásticas na interface materno-fetal é um processo chave na placentação e essencial para o sucesso da gestação em mulheres e roedores. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a migração trofoblástica intrauterina e a expressão de transcritos gênicos envolvidos neste processo na placenta de ratas hipotireoideas e tratadas com L-tiroxina (T4). Cento e vinte e seis ratas adultas foram divididas igualmente nos grupos hipotireoideo, tratado com T4 e eutireoideo (controle). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil. Os animais foram eutanasiados aos 10, 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação. Foram avaliadas a profundidade da invasão trofoblástica intrauterina intersticial e endovascular bem como a expressão gênica de leptina placentária e das metaloproteinases 2 e 9 (MMP2, MMP9) pelo RT-PCR tempo real. Os dados foram analisados pelo teste SNK. O hipotireoidismo reduziu a migração trofoblástica endovascular aos 16 e 17 dias de gestação, bem como a migração trofoblástica intersticial aos 15 e 17 dias de gestação ($P < 0,05$). Além disso, o hipotireoidismo reduziu a expressão de mRNA das MMPs 2 e 9 e de leptina placentária ($P < 0,05$). O excesso de T4 aumentou a expressão de mRNA de MMP2 aos 10 dias de gestação ($P < 0,05$), mas reduziu a migração trofoblástica endovascular aos 18 dias de gestação ($P < 0,05$). Conclui-se que o hipotireoidismo e excesso de T4 afetam a migração trofoblástica intrauterina, especialmente o hipotireoidismo, sendo estes efeitos dependentes do período gestacional.

Palavras-chave: disfunção tireoidiana, migração, trofoblasto, rata

ABSTRACT

The migration of trophoblast cells in the maternal-fetal interface is a key process in placentation and essential for the success of pregnancy in women and rodents. Because of that, the objective of this study was to evaluate the intrauterine trophoblast migration and the expression of gene transcripts involved in this process in the placenta of hypothyroid and L-thyroxine (T4)-treated rats. One hundred twenty-six adult female rats were divided equally in the groups hypothyroid, T4-treated and control. The hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil. The animals were sacrificed at 10, 14, 15, 16, 17 and 18 days of gestation. It was evaluated the depth of interstitial and endovascular intrauterine trophoblast invasion and the gene expression of placental leptin and metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2, MMP-9) by real time RT-PCR. The data were analyzed by SNK test. Hypothyroidism reduced the endovascular trophoblast migration at 16 and 17 days of gestation ($P < 0.05$), as well the interstitial trophoblast migration at 15 and 17 days of gestation ($P < 0.05$). Furthermore, hypothyroidism reduced the mRNA expression of the MMPs 2 and 9 and of placental leptin ($P < 0.05$). Excess of T4 increased the mRNA expression of MMP-2 at 10 days of gestation ($P < 0.05$), but reduced at 18 days of gestation the endovascular trophoblast migration ($P < 0.05$). We conclude that hypothyroidism and excess of T4 affect the intrauterine trophoblast migration, especially the hypothyroidism, and these effects are dependent of the gestational period.

Key words: thyroid dysfunction, migration, trophoblast, rat

INTRODUÇÃO

A migração de células trofoblásticas na interface materno-fetal é um processo chave na placentação e, conseqüentemente, essencial para o sucesso da gestação em mulheres e roedores (Hammer, 2011). Falhas na placentação devido a extensiva invasão trofoblástica ou invasão trofoblástica superficial são causas de complicações obstétricas e neonatais importantes como a pré-eclâmpsia, a restrição de crescimento intra-uterino, o aborto precoce, prematuridade ou até mesmo a morte materna ou fetal (Hammer, 2011; Soares *et al.*, 2012). Por isso, algumas pesquisas têm procurado avaliar os mecanismos moleculares que controlam a invasão do trofoblasto em condições fisiológicas e patológicas (Rosario *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012). Contudo, embora haja pesquisas que avaliaram o efeito de disfunções endócrinas na migração de células trofoblásticas (Shimonovitz *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2004; Miko *et al.*, 2011; Gambino *et al.*, 2012), não há estudos sobre o efeito do hipo e do hipertireoidismo na cinética de migração trofoblástica intrauterina.

Sabe-se que a hipofunção tireoidiana afeta o desenvolvimento feto-placentário por prejudicar a decidualização, a vascularização e o desenvolvimento placentário, e por aumentar a apoptose e reduzir a proliferação das células trofoblásticas (Galton *et al.*, 2001; Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2012). O hipertireoidismo, em contrapartida, aumenta a eficiência reprodutiva em modelos animais experimentais, uma vez que causa alterações placentárias importantes no que concerne à proliferação celular sem alterar a viabilidade embrionária e fetal (Serakides *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007). Vale ressaltar que estas alterações placentárias observadas no hipo e no hipertireoidismo podem ser influenciadas pela cinética de migração das células trofoblásticas (Knöfler, 2010; Hammer, 2011; Chakraborty *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012).

Os trofoblastos invasivos desempenham numerosas funções como a de ancorar a placenta ao tecido materno, secreção de hormônios, modulação da angiogênese e linfangiogênese decidual e remodelamento das artérias espiraladas uterinas maternas (Knöfler, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011). As modificações

vasculares são fundamentais para aumentar o fluxo sanguíneo para a placenta e assegurar, desse modo, a transferência adequada de nutrientes e oxigênio para o feto em desenvolvimento (Knöfler, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011).

Silva *et al.* (2012) observaram que a placenta de ratas com hipotireoidismo apresenta alteração na população de células de glicogênio como também de células gigantes trofoblásticas, sugerindo uma falha na cinética de migração dessas células em direção à decídua. Além disso, a vascularização placentária de ratas com hipotireoidismo está comprometida (Silva *et al.*, 2012). É importante ressaltar que uma redução da invasão trofoblástica na decídua compromete a vascularização na interface materno-fetal, resultando em estresse oxidativo na placenta. Isto tem sido implicado na patogênese da pré-eclâmpsia, do aborto precoce e do parto prematuro (Burdon *et al.*, 2007).

As pesquisas têm mostrado que um número cada vez maior de fatores de crescimento e angiogênicos, citocinas e proteases controlam a cinética de migração da célula trofoblástica (Soares *et al.*, 2012). Entre estes fatores estão as metaloproteinases de matriz 2 e 9, a leptina placentária, o fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento semelhante a insulina-1 (Knöfler, 2010; Soares *et al.*, 2012). No entanto, ainda há pouca informação sobre como estes fatores influenciam a dinâmica das células trofoblásticas na interface materno-fetal (Ain *et al.*, 2003). A falha na cinética de migração das células trofoblásticas no hipotireoidismo necessita ser comprovada, bem como a participação das metaloproteinases nesse processo *in vivo*, já que *in vitro* a expressão de metaloproteinases pelas células trofoblásticas é responsiva a triiodotironina (Oki *et al.*, 2004). A hipótese do presente estudo é de que as disfunções tireoidianas alteram a cinética de migração das células trofoblásticas como também a expressão de metaloproteinases e de leptina placentária. Isto explicaria, pelo menos em parte, as alterações placentárias observadas no hipo e no hipertireoidismo (Galton *et al.*, 2001; Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012).

Por isso, estudar a cinética de migração das células trofoblásticas como também a expressão

gênica das metaloproteinases 2 e 9 e da leptina placentária na placenta de ratas com disfunção tireoidiana é importante e consiste o objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 268/2011) (ANEXO 1).

Indução das disfunções tireoidianas e acasalamento

Cento e vinte e seis ratas Wistar adultas foram usadas neste estudo (Figura 1). Os animais foram alojados em caixas plásticas com seis ratas/caixa no regime de 12hs de luz e 12hs de escuro. As ratas foram alimentadas com ração comercial contendo 22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio e 0,6% de fósforo. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum*.

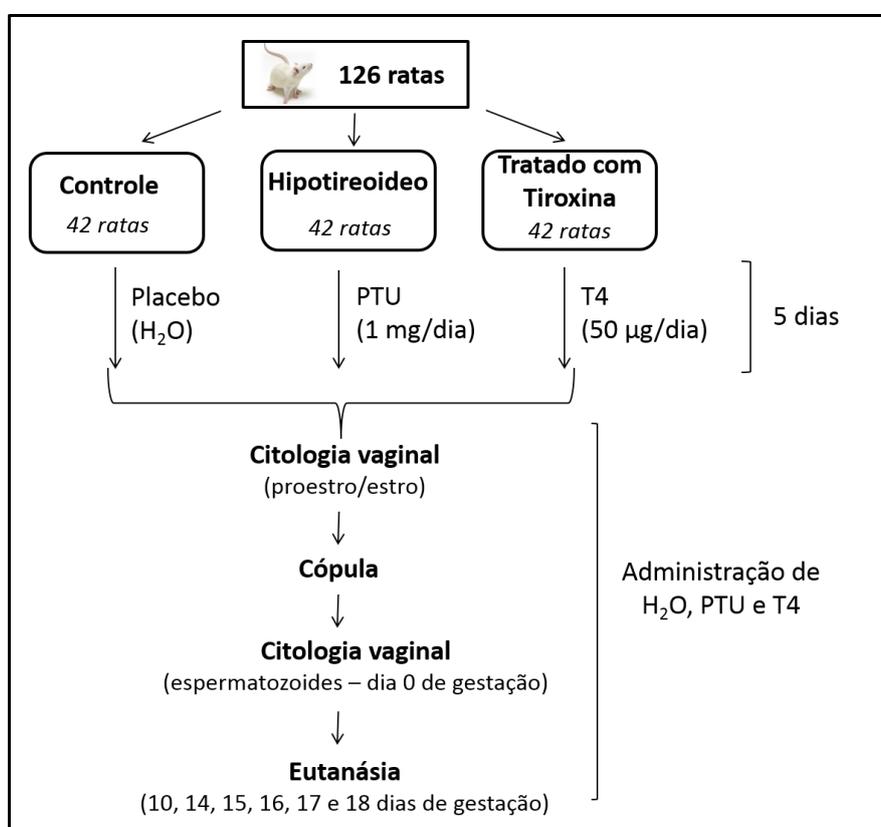


Figura 1. Organograma do manejo reprodutivo, indução das disfunções tireoidianas e eutanásia das ratas.

Depois de um período de adaptação de sete dias, as ratas foram divididas aleatoriamente em três grupos (controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina), com 42 animais por grupo.

O hipotireoidismo foi induzido pela administração de propiltiouracil (PTU)⁴⁴ diluído

em 5 mL de água destilada, de acordo com Silva *et al.* (2004), utilizando uma sonda orogástrica (1mg/animal/dia). As ratas tratadas com tiroxina receberam L-tiroxina (T4)⁴⁵ diluída em 5 mL de água destilada, como descrito por Serakides *et al.* (2001), utilizando uma sonda orogástrica (50µg/animal/dia). As ratas do grupo controle

⁴⁴ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

⁴⁵ Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

receberam 5 mL de água destilada, por dia, como placebo.

Cinco dias após o início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral. Seis ratas de cada grupo também foram eutanasiadas com uma overdose de anestésico⁴⁶ para coleta de sangue, dosagem de T3 e T4 livre e confirmação da indução da disfunção tireoidiana. As ratas em proestro e estro foram mantidas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 h. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram obtidos para detectar espermatozoides. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, e esse dia foi considerado dia 0 de gestação. Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas. Os animais dos grupos hipotireoideo, tratado com tiroxina e controle continuaram a receber PTU, T4 e água, respectivamente, por sonda orogástrica, durante todo o período experimental.

Análise hormonal

Aos 0, 10, 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com overdose de anestésico⁴⁷. Aos 0 e 19 dias de gestação, o sangue foi colhido com anti-coagulante (heparina) das ratas, sendo o plasma separado por centrifugação e armazenado a -20 °C para a dosagem de T3 e T4 livre, quando utilizou-se a técnica de ELISA de quimiluminescência (sensibilidade: 0,4 ng/dL), com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante⁴⁸.

Necropsia e coleta de material

Na necropsia, o útero foi colhido juntamente com a placenta e os fetos. Seis discos placentários por rata foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C durante 24 h e foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Para realizar as avaliações morfológicas e de imunoistoquímica, cortes histológicos (4µm) dos discos placentários foram obtidos e colocados em lâminas silanizadas. Três discos placentários sem decídua por rata também foram dissecados, congelados

em nitrogênio líquido por 24 horas e armazenados a -80°C para posterior avaliação da expressão gênica de MMP2 e 9 e de leptina placentária usando RT-PCR tempo real.

Avaliação morfológica e imunoistoquímica

As células trofoblásticas invasoras da rata foram detectadas utilizando o anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3⁴⁹ na diluição de 1:100.

Para imunoistoquímica foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase⁵⁰ e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando solução Retrieval. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro bloqueio⁵¹ e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina⁵². As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris⁵³. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

A profundidade da invasão trofoblástica intrauterina intersticial e endovascular foi usada para determinar um índice de invasão de acordo com Rosario *et al.* (2008) (Figura 2). A invasão trofoblástica endovascular foi avaliada pela medida da distância do local de célula trofoblástica endovascular positiva para citoqueratina em relação à camada do sinciotrofoblasto/distância total da camada do sinciotrofoblasto até a camada mesometrial externa do útero. A invasão trofoblástica intersticial foi medida pela distância do local de célula trofoblástica intersticial positiva para citoqueratina em relação à camada do sinciotrofoblasto/ distância total da camada do sinciotrofoblasto até a camada mesometrial externa do útero. A profundidade da invasão de células trofoblásticas intrauterinas foi avaliada a partir de um plano histológico no centro de cada local de placentação. Todas as análises foram

⁴⁶ 2,5% Tionembutal; ABBOTT, São Paulo, Brasil

⁴⁷ 2,5% Tionembutal; ABBOTT, São Paulo, Brasil

⁴⁸ IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA

⁴⁹ AE1, AE3 Clone, Dako, St Louis, MO, EUA

⁵⁰ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA

⁵¹ Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

⁵² DAB, Ultra Vision, Fremont, CA, EUA

⁵³ Hematoxilina de Harris, Merck, Darmstadt, DE

realizadas em discos placentários com 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação.

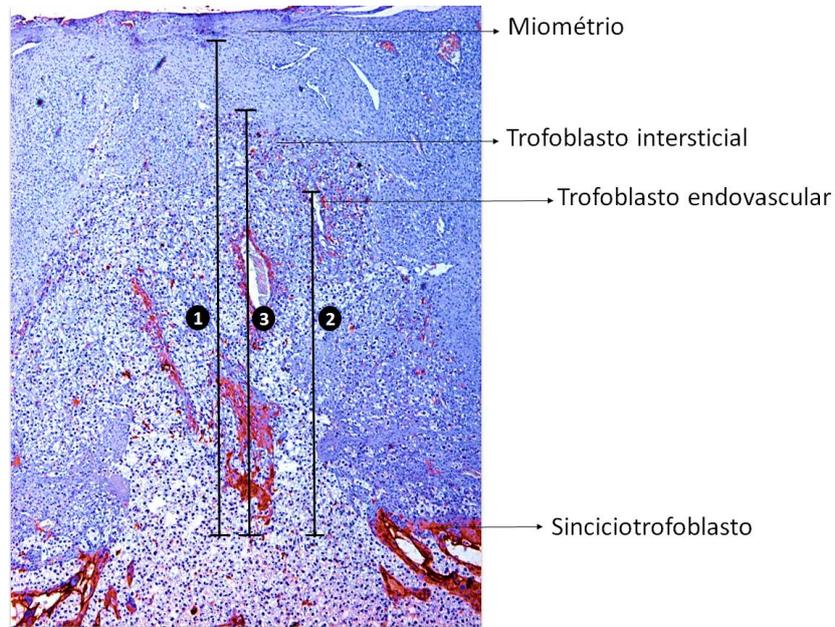
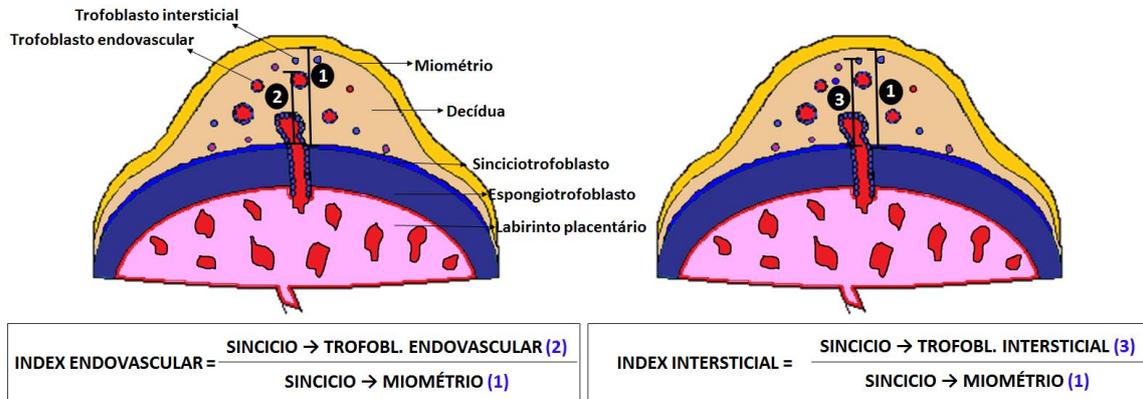


Figura 2. Histomorfometria da migração trofoblástica intrauterina endovascular e intersticial.

RT-PCR tempo real

O mRNA total dos discos placentários foi extraído usando o reagente Trizol⁵⁴ de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 1µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *Platinum SuperScript III qPCR*

*Two-Step com SYBR Green*⁵⁵. As reações de RT-PCR foram realizadas em um termociclador *Smart Cycler II*⁵⁶. A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde os valores das amostras foram calculados e calibrados em relação aos valores do CT de β -actina. Os primers estão na Tabela 1. Todas as

⁵⁴ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

⁵⁵ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA

⁵⁶ Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, EUA

análises foram realizadas nos discos placentários com 10, 14 e 18 dias de gestação.

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.

Genes	Primers	Número de acesso
MMP2	forward 5' - TGGGCCCTCCCCTGATGCTG -3' reverse 5' - AGCAGCCCAGCCAGTCCGAT -3'	NM_031054.2
MMP9	forward 5' - TGCACCACCTTACCGGCCCT -3' reverse 5' - CAGCGCCCAGGCACAGTAA -3'	NM_031055.1
Leptina placentária	forward 5' - CTGGAGACCCCTGTGCCGGT -3' reverse 5' - GCCTGGCGGATACCGACTGC -3'	NM_013076.3
β -actina	forward 5' - TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3' reverse 5' - CGACGAGCGCAGCGATATCGT -3'	NM_031144.2

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 3X3 (três grupos; três períodos gestacionais) para a avaliação da expressão gênica e 3X5 (três grupos; cinco períodos gestacionais) para a avaliação da cinética de migração. Os valores médios com o desvio padrão dos grupos experimentais foram determinados e foi realizada análise de variância (ANOVA). O teste de *Student Newman Keuls* (SNK) foi utilizado para comparar as médias dos grupos hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação ao controle. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

RESULTADOS

Indução das disfunções tireoidianas

A indução do hipotireoidismo e excesso de T4 durante todo o período gestacional foi confirmada pela concentração plasmática de T3 e T4 livre nos dias 0 e 19 de gestação e pela sintomatologia apresentada pelos animais. As ratas tratadas com PTU apresentaram concentrações menores de T3 e T4 livre em relação às do grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 3) e sinais clínicos de letargia e alopecia. As ratas

tratadas com tiroxina exibiram concentrações maiores de T4 livre quando comparadas às dos animais do grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 3) e apresentaram sinais clínicos caracterizados por agressividade e exoftalmia.

Cinética da migração trofoblástica intrauterina

Aos 16 e 17 dias de gestação, os discos placentários dos animais hipotireoideos apresentaram redução do índice de invasão trofoblástica endovascular em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figuras 4 e 5), sendo o mesmo observado aos 15 e 17 dias de gestação em relação ao índice de invasão trofoblástica intersticial ($P < 0,05$) (Figuras 4 e 5).

Já em relação aos animais tratados com tiroxina, aos 18 dias de gestação observou-se redução da invasão trofoblástica endovascular em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 4), não sendo observadas diferenças nos outros períodos gestacionais ($P > 0,05$). Em relação à invasão trofoblástica intersticial, o grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças em relação ao grupo controle em nenhum dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$) (Figura 4).

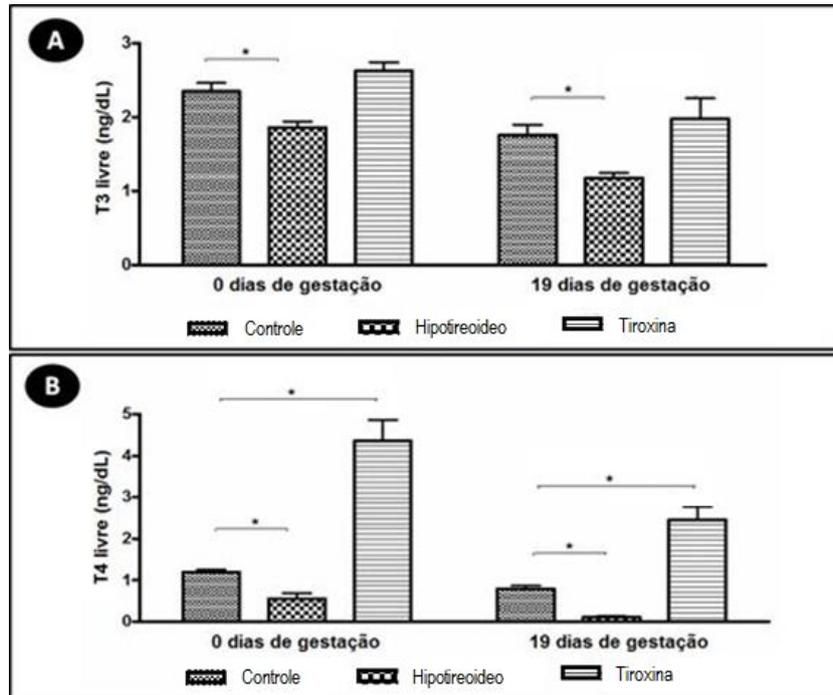


Figura 3. Concentrações plasmáticas de T3 (A) e T4 (B) livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação. (*P<0,05)

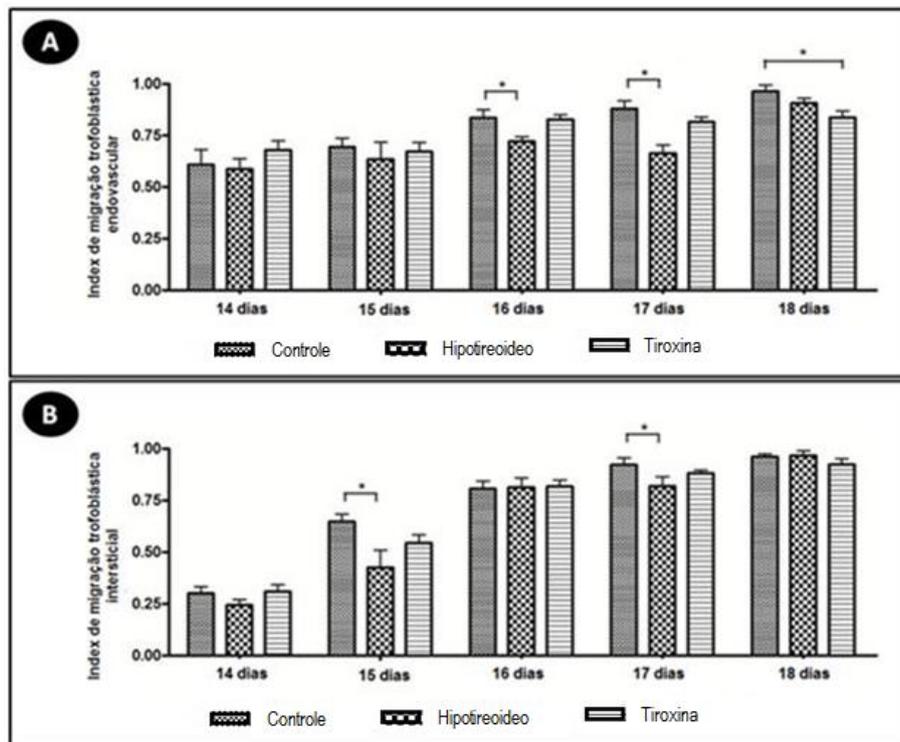


Figura 4. A e B) Index (média±DP) de migração endovascular (A) e intersticial (B) das células trofoblásticas na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação. (*P<0,05)

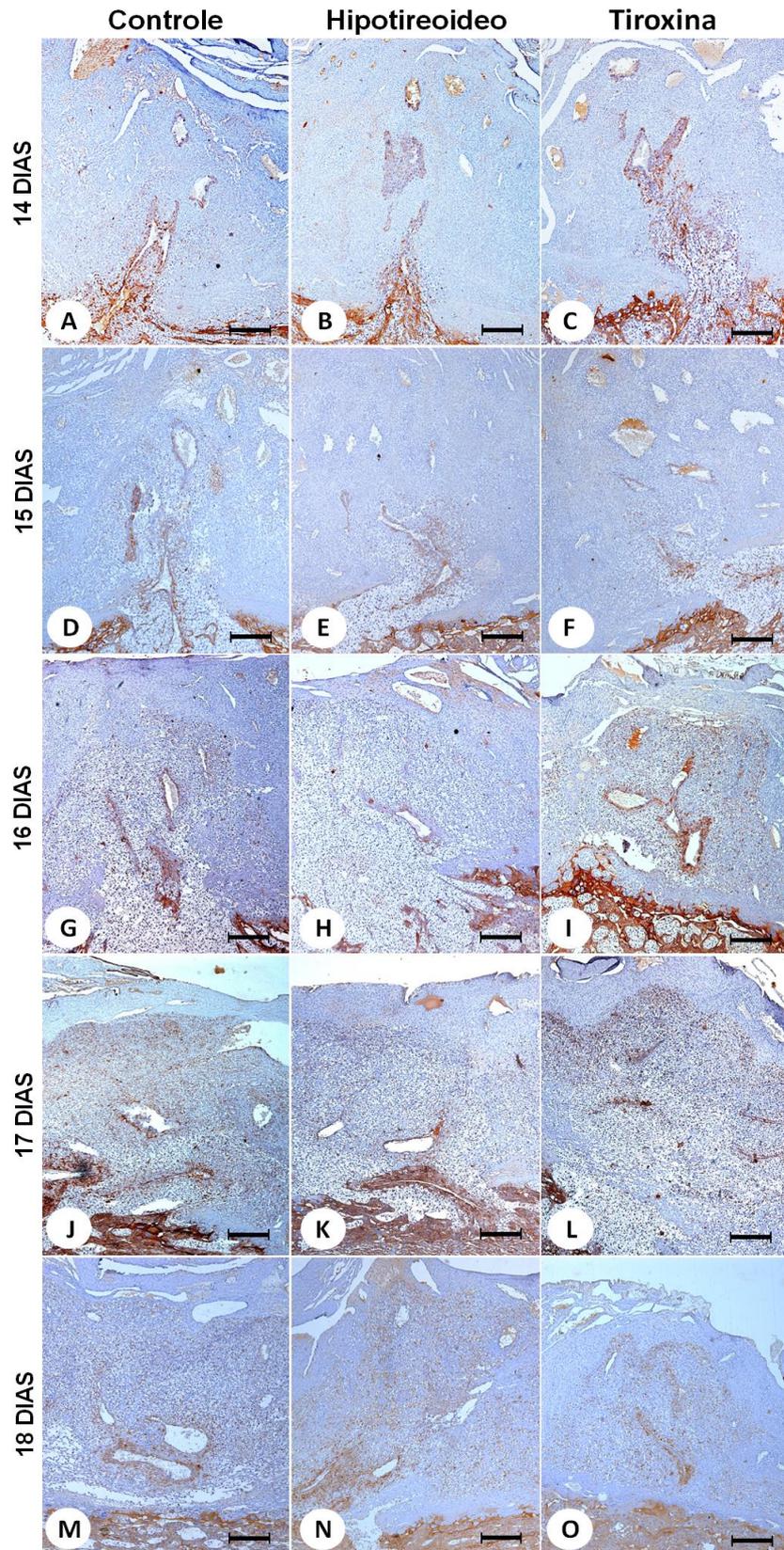


Figura 5. Imagens de imunistoquímica representando a cinética de migração das células trofoblásticas endovascular e intersticial na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 (A-C), 15 (D-F), 16 (G-I), 17 (J-L) e 18 (M-O) dias de gestação. G-I) Invasão trofoblástica endovascular menor nas ratas do grupo hipotireoideo (H) em relação ao grupo controle (G) aos 16 dias de gestação. J-L) Menor invasão trofoblástica intersticial nas ratas do grupo hipotireoideo (K) em relação ao grupo controle (J) aos 17 dias de gestação. M-O) Menor invasão trofoblástica intersticial nas ratas do grupo tratado com tiroxina (O) em relação ao grupo controle (M) aos 18 dias de gestação. (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado pela Hematoxilina de Harris, Barra = 360µm).

Expressão gênica das metaloproteinases de matriz 2 e 9

No decorrer da gestação, nos três grupos experimentais, a expressão gênica para MMP2 nos discos placentários foi maior aos 18 dias de gestação. Contudo, os animais hipotireoideos apresentaram redução da expressão de mRNA para MMP2 aos 14 dias de gestação em relação às ratas controle ($P < 0,05$) (Figura 6A). Os animais tratados com tiroxina, ao contrário do grupo hipotireoideo, apresentaram aumento da expressão de mRNA para MMP2 em comparação aos animais controle aos 10 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 6A).

Diferente da expressão gênica para MMP2, a expressão de MMP9 durante a gestação foi maior aos 14 dias de gestação nos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina em relação aos outros períodos gestacionais avaliados. No entanto, os animais hipotireoideos apresentaram redução da expressão do mRNA para MMP9 em

relação às ratas controle aos 18 dias de gestação ($P > 0,05$) (Figura 6B). O grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças quanto à expressão gênica para MMP9 em comparação ao grupo controle em nenhum dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$) (Figura 6B).

Expressão gênica de leptina placentária

Durante a gestação, a expressão gênica para leptina placentária nos discos placentários foi maior no dia 10 em relação aos 14 e 18 dias de gestação. Similar ao que observou-se quanto à expressão gênica para MMP-2, os animais hipotireoideos também apresentaram redução da expressão do mRNA para leptina placentária em relação às ratas controle aos 14 dias de gestação ($P < 0,05$) (Figura 6C). O grupo tratado com tiroxina não apresentou diferenças quanto à expressão gênica para leptina placentária em comparação ao grupo controle em nenhum dos períodos gestacionais avaliados ($P > 0,05$) (Figura 6C).

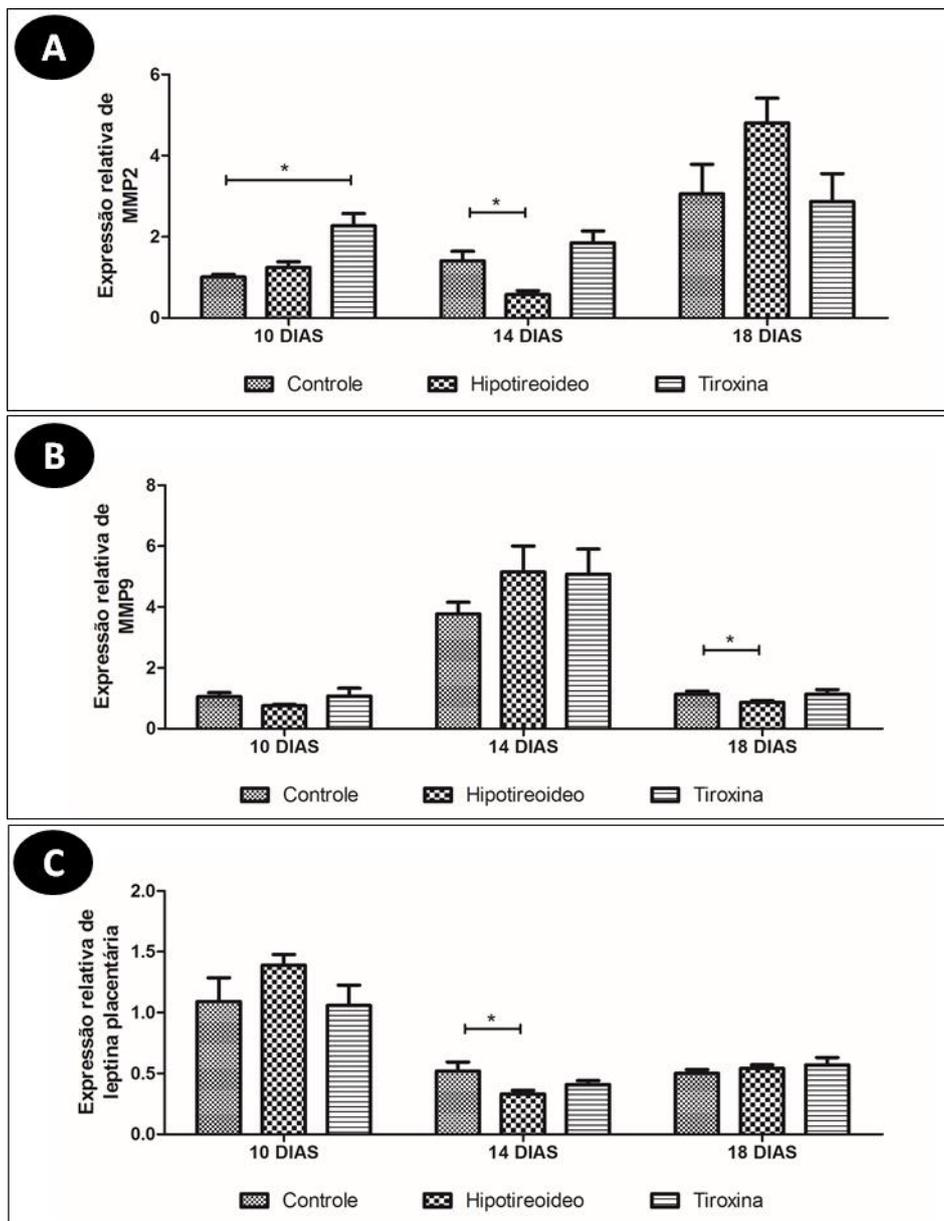


Figura 6. A, B e C) Expressão relativa de transcritos gênicos para MMP2 (A) MMP9 (B) e leptina placentária (C) (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 10, 14 e 18 dias de gestação. (*P<0,05)

DISCUSSÃO

As disfunções tireoidianas maternas afetaram a cinética de migração das células trofoblásticas em direção a decídua, sendo este efeito dependente do período gestacional. Assim, o presente estudo confirmou a nossa hipótese e a suspeita de Silva *et al.* (2012) de que a migração

das células trofoblásticas é afetada nas disfunções tireoidianas, principalmente no hipotireoidismo.

O hipotireoidismo reduziu a invasão intrauterina de células trofoblásticas endovasculares e de células trofoblásticas intersticiais. As células trofoblásticas invasoras, que se originam da zona

juncional, participam do remodelamento vascular uterino, além da secreção de hormônios. Estas células envolvem e penetram as artérias espiraladas uterinas (Ain *et al.*, 2003; Caluwaerts *et al.*, 2005; Konno *et al.*, 2007). Pesquisas têm mostrado que as artérias presentes na interface materno-fetal começam a se dilatar quando estão próximas de trofoblastos intersticiais (Kaufmann *et al.*, 2003). Estas células trofoblásticas expressam óxido nítrico sintetase, óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e, possivelmente, óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (Kaufmann *et al.*, 2003). Cartwright *et al.* (1999) também demonstraram que a motilidade celular e a invasão trofoblástica *in vitro* são fortemente dependentes da NOS produzida pelo próprio trofoblasto. Ratas com hipotireoidismo apresentam redução da expressão de mRNA de iNOS durante a gestação (Silva *et al.*, 2014). A coordenação precisa de todo o processo de remodelamento vascular uterino é fundamental para o sucesso da gestação (Burton, 2009). Ela garante a chegada adequada de nutrientes para o feto além de evitar a exposição inadequada do feto aos efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio (Burton, 2009). Assim, os resultados do presente estudo explicam, pelo menos em parte, o baixo desenvolvimento fetal encontrado em ratas com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2012). Falhas no remodelamento vascular uterino têm sido associadas a patologias gestacionais como a pré-eclâmpsia, a restrição de crescimento intrauterino e o parto prematuro (Rosario *et al.*, 2008).

Os animais hipotireoideos também apresentaram redução da expressão gênica das MMPs 2 e 9 e de leptina placentária, ao contrário dos animais tratados com tiroxina, quando observou-se aumento do transcrito gênico para MMP2. As MMPs 2 e 9, sintetizadas principalmente pelas células trofoblásticas na interface materno-fetal, permitem a migração celular por degradar proteínas da matriz extracelular (Lala e Chakraborty, 2003; Varanou *et al.*, 2006). Estes resultados estão de acordo com Oki *et al.* (2004) ao observarem que a deficiência dos hormônios tireoideanos *in vitro* reduz a expressão de mRNA das MMPs 2 e 3, de fibronectina fetal e de integrinas pelo trofoblasto extraviloso humano. A expressão das MMPs 2 e 9 também é estimulada pela leptina placentária (Gambino *et al.*, 2012), corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

A leptina placentária é um hormônio chave na placenta (Gambino *et al.*, 2012) por induzir a proliferação de células trofoblásticas e inibir a apoptose. Além disso, regula o crescimento e o desenvolvimento fetal por afetar o processo de condrogênese e de osteogênese (Masuzaki *et al.*, 1997; Senaris *et al.*, 1997; Henson *et al.*, 1998; Gambino *et al.*, 2010; Miko *et al.*, 2011; Gambino *et al.*, 2012). Ratas com hipotireoidismo apresentam redução da proliferação das células trofoblásticas, aumento da apoptose e redução do desenvolvimento fetal (Silva *et al.*, 2012). A deficiência de leptina placentária tem sido implicada na patogênese de diversas patologias gestacionais em humanos como o aborto recorrente, a diabetes gestacional, o retardo do crescimento intrauterino e a pré-eclâmpsia (Bajoria *et al.*, 2002; Sagawa *et al.*, 2002; Gambino *et al.*, 2012). Assim, a redução da expressão gênica da leptina placentária como também das MMPs 2 e 9 nas ratas hipotireoideas justifica a falha na cinética de migração das células trofoblásticas apresentada por estes animais.

As maiores concentrações plasmáticas de progesterona em ratas hipotireoideas (Hatsuta *et al.*, 2004) favorece também a redução da migração das células trofoblásticas. A progesterona reduz a secreção de gelatinase e de MMP2 e 9 pelo trofoblasto (Shimonovitz *et al.*, 1998; Dai *et al.*, 2003; Spencer *et al.*, 2004; Miko *et al.*, 2011). O fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), identificado em humanos e camundongos, foi inicialmente descrito como uma molécula induzida pela progesterona para mediar os efeitos dela durante a gestação (Szekeres-Bartho *et al.*, 1985). Foi constatado que o PIBF reduz a expressão de leptina placentária e seu receptor, demonstrando outra via pela qual a progesterona pode também afetar a invasão trofoblástica (Miko *et al.*, 2011).

A menor invasão trofoblástica endovascular observada nos animais tratados com tiroxina, aos 18 dias de gestação, pode estar relacionada ao parto prematuro apresentado por estes animais (Navas *et al.*, 2011). Para a ocorrência do parto e após o parto há morte e remoção das células trofoblásticas invasoras (Soares *et al.*, 2012). Isto é importante para a ocorrência adequada do parto, sendo também crítico para a saúde da mãe e para o sucesso das gestações subsequentes (Soares *et al.*, 2012). Uma maior invasão

intrauterina de células trofoblásticas ao final da gestação, acompanhada por falha em sua remoção da decídua uterina, ao contrário do que se observou nas ratas tratadas com T4, é uma importante causa de retenção de placenta, parto distócico e hemorragia pós-parto na mulher e em espécies animais domésticas, podendo ser fatal (Tantbirojn *et al.*, 2008; Rosario *et al.*, 2009).

Conclui-se que as disfunções tireoidianas maternas afetam a migração trofoblástica intrauterina, principalmente no hipotireoidismo, sendo este efeito dependente do período gestacional. O hipotireoidismo experimental reduz a expressão gênica das MMPs 2 e 9 e de leptina placentária, ao contrário do excesso de T4 experimental que aumenta a expressão gênica de MMP2.

CAPÍTULO 5

Efeitos *in vitro* da triiodotironina na expressão de transcritos gênicos em células trofoblásticas de camundongo

In vitro effects of triiodothyronine on the gene transcripts expression in mouse trophoblast cells

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a diferenciação e a expressão gênica *in vitro* de fatores hormonais, angiogênicos e imunes em células trofoblásticas de camundongo com diferentes doses de T3. Vinte e cinco camundongos fêmeas adultas foram eutanasiadas com 7,5 dias de gestação. Os cones ectoplacentários foram dissecados dos tecidos maternos e cultivados durante 24 e 48 horas em meio padrão sem T3 (controle) e com diferentes doses de T3 (10^{-9} M, 10^{-7} M, 10^{-4} M). A expressão gênica de Tpbp, Prl3b1, VEGF, PGF, PL-1 e $\text{INF}\gamma$ foi avaliada nas células trofoblásticas por RT-PCR tempo real. Os dados foram analisados pelo teste SNK. As doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram a expressão do mRNA para Tpbp, PGF, $\text{INF}\gamma$ e PL-1 com 24 e/ou 48 horas de cultivo. Além disso, a dose de 10^{-7} M de T3 aumentou a expressão gênica de VEGF e Pl3b1 com 24 horas de cultivo. A dose de 10^{-4} M de T3, pelo contrário, reduziu a expressão de mRNA para PL-1 e VEGF com 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente. Conclui-se que as doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentam a diferenciação e expressão gênica de fatores hormonais, angiogênicos e imunes pelas células trofoblásticas de camundongos e esses efeitos são dependentes do tempo de cultivo. Em contraste, a dose de 10^{-4} M de T3 reduz a expressão gênica de VEGF e PL-1 pelas células trofoblásticas.

Palavras-chave: triiodotironina, trofoblasto, cultura, diferenciação, camundongo

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the differentiation and gene expression in vitro of hormonal, immune and angiogenic factors in mouse trophoblast cells with different doses of T3. Twenty-five adult female mouse were sacrificed at 7,5 days of gestation. Ectoplacental cones were dissected from the maternal tissues and cultured during 24 and 48 hours in standard medium without T3 (control) and with different doses of T3 (10^{-9} M; 10^{-7} M; 10^{-4} M). The gene expression of Tpbp, Prl3b1, VEGF, PGF, PL-1, and $\text{INF}\gamma$ was evaluated in trophoblast cells by real-time RT-PCR. The data were analyzed using an SNK test. The doses of 10^{-7} and 10^{-9} M of T3 increased the mRNA expression for Tpbp, PGF, $\text{INF}\gamma$, and PL-1 with 24 and/or 48 hours of culture. In addition, the dose of 10^{-7} M of T3 also increased the gene expression for Pl3b1 and VEGF with 24 hours of culture. The dose of 10^{-4} M of T3, on the contrary, reduced the mRNA expression for PL-1 and VEGF with 24 and 48 hours of culture, respectively. In conclusion, the doses of 10^{-7} and 10^{-9} M of T3 increased the differentiation and gene expression of hormonal, immune and angiogenic factors by mice trophoblast cells and these effects were dependent of the culture time. In contrast, the dose of 10^{-4} M of T3 reduced the gene expression of VEGF and PL-1 by trophoblast cells.

Keywords: triiodothyronine, trophoblast, culture, differentiation, mouse

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são vitais para a função reprodutiva normal, pois influenciam o desenvolvimento normal da placenta (Cross, 2005). Durante este processo, células trofoblásticas se diferenciam e produzem diversos fatores de crescimento e de sinalização que são críticos para o desenvolvimento feto-placentário (Oda *et al.*, 2006; Hu e Cross, 2010). Como o hipotireoidismo materno causa aborto precoce em mulheres (Maruo *et al.*, 1992) e tanto o hipo quanto o hipertireoidismo resultam em alteração na população de células trofoblásticas na placenta de ratas (Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012), é plausível que a diferenciação destas células no início da gestação possa ser afetada pelos hormônios tireoidianos.

Lactogênio placentário 1 (PL-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento placentário (PGF) e interferon gama (IFN γ) são produzidos pela célula trofoblástica diferenciada e influenciam o desenvolvimento vascular placentário, a imunologia placentária e o metabolismo materno-fetal (Kim *et al.*, 2005; Plaisier *et al.*, 2009; Hu e Cross, 2010). Todos estes fatores são afetados pelas disfunções tireoidianas na placenta de ratas (Silva *et al.*, 2014a; Silva *et al.*, 2014b), mas não se sabe se este efeito é resultante de uma ação direta ou indireta dos hormônios tireoidianos na célula trofoblástica. Pesquisas *in vitro* já mostraram que a triiodotironina (T3) aumenta a atividade endócrina e o potencial invasivo da célula trofoblástica (Maruo *et al.*, 1991; Oki *et al.*, 2004), mas ainda não há nenhum estudo que avaliou o efeito da T3 na expressão *in vitro* de fatores angiogênicos e imunológicos pela célula trofoblástica. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel *in vitro* da triiodotironina na expressão de transcritos gênicos envolvidos na diferenciação e na atividade endócrina, angiogênica e imune de células trofoblásticas de camundongo.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 268/11).

Manejo dos animais e acasalamento

Vinte e cinco camundongos fêmeas Balb-C com 2 meses de idade foram alojadas em caixas plásticas onde receberam a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 7 dias de adaptação, os camundongos foram submetidos à citologia vaginal para acompanhamento do ciclo estral. Os camundongos em proestro foram alojados em caixas plásticas com camundongos machos por 12 horas durante a noite. Após esse período, a cópula foi confirmada pela observação do *plug* nas fêmeas e esse dia foi designado como 0,5^o dia de gestação. Após a cópula, os camundongos foram alojados em caixas separadas.

Extração e cultivo das células trofoblásticas

Com 7,5 dias de gestação os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico⁵⁷ para a extração e o cultivo das células do cone ectoplacentário, conforme Hoshida *et al.* (2007).

Após a eutanásia, o útero desses animais foi imediatamente dissecado em solução de fosfato tamponada (PBS) estéril contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Com o uso de um bisturi, cuidadosamente foi separado o embrião da decídua e dissecado o cone ectoplacentário do tecido embrionário remanescente.

Os cones ectoplacentários dos grupos experimentais foram cultivados em placas de 6 poços com 3ml de meio padrão (DMEM-F12)/poço, suplementado com 10% de FBS, 0,5 mg/mL de lactato de cálcio, 0,2 ng/mL de Mito+TMSerum Extender⁵⁸ e antibiótico-antimicótico (60 μ g/L de gentamicina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina e 25 μ g/L de anfotericina). Os cones foram cultivados por 24h sob condição padrão (36,5°C, 5% de CO₂ e humidade). O período experimental iniciou-se neste ponto, ou seja, após 24 h de cultivo (tempo experimental= 0 h).

⁵⁷ 2,5% Tionembutal; Abbott, São Paulo, Brazil

⁵⁸ Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA

A caracterização da população de células trofoblásticas foi realizada por meio da imunolocalização positiva de filamentos intermediários de citoqueratina endo-A e reatividade negativa para vimentina, conforme Hoshida *et al.* (2007) e Leanza *et al.* (2007). As células foram cultivadas em poços com lamínula (22x22mm) para depois serem fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min. Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase⁵⁹. As lâminas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio⁶⁰ e estreptavidina peroxidase. Os anticorpos primários, anticorpo anti-citoqueratina⁶¹ e anti-vimentina⁶², foram diluídos a 1:100 e 1:200, respectivamente. A incubação com anticorpo secundário⁶³ foi realizada por 45 minutos. O cromógeno foi a diaminobenzidina⁶⁴. As secções foram contraincubadas com hematoxilina de Harris⁶⁵. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG. Considerou-se uma cultura pura de células trofoblásticas quando a população celular era 100% positiva para citoqueratina AE1-AE3 e negativa para vimentina.

No tempo 0 de cultivo, três cones ectoplacentários/poço foram cultivados em placas de 6 wells com 3 mL de meio/poço. Foram cultivados 6 poços/tratamento para cada período experimental. Os grupos eram formados pelo controle (sem 3,3',5-triiodo-L-tironina; T3) e tratados com diferentes doses de T3 (10^{-9} ; 10^{-7} e 10^{-4} M de T3) em dois períodos de tempo (24 e 48 horas). As doses de T3 foram estabelecidas conforme estudos realizados por Maruo *et al.* (1991) e Oki *et al.* (2004), que avaliaram o efeito da T3 na síntese de lactogênio placentário.

Nos tempos 24 e 48 horas de cultivo avaliou-se a expressão gênica de fatores envolvidos na diferenciação e na atividade endócrina,

angiogênica e imune das células trofoblásticas no grupo controle e nas diferentes doses de T3.

A diferenciação em espongiotrofoblastos e trofoblasto invasivo foi avaliada pela expressão de mRNA para proteína alfa específica de trofoblastos (Tpbpa) e prolactina 3b1 (Pr13b1), respectivamente. O perfil endócrino foi avaliado pela expressão gênica de lactogênio placentário 1 (PL-1); o perfil angiogênico pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento placentário (PGF) e o perfil imune pela expressão de interferon gama (INF γ). Todas as avaliações foram feitas pela RT-PCR tempo real.

Quantificação relativa dos transcritos gênicos para Tpbpa, Pr13b1, PL-1, VEGF, PGF e INF- γ pela RT-PCR tempo real

Para a técnica de RT-PCR tempo real a extração do RNA total das células como também a síntese do cDNA e as reações de PCR foram realizadas utilizando Kit comercial⁶⁶. As reações de RT-PCR foram conduzidas no termociclador Smart Cycler II⁶⁷. Foram realizadas as reações de PCR utilizando-se 4 μ L de cDNA, 600nM de cada primer e 10 μ L do reagente Syber Green acrescido de água DNase e RNAase free até obter-se um volume final de 20 μ L de reação. As reações foram realizadas no aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System⁶⁸. Os primers foram delineados com base na sequência do mRNA para *Mus musculus* (Tabela 1).

A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de GAPDH *Mus musculus*.

⁵⁹ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA

⁶⁰ Ultra vision Block, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA

⁶¹ Clone AE1-AE3, Dako, St Louis, MO, USA

⁶² Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA

⁶³ Biotin Goat, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA

⁶⁴ DAB Substrate system, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA

⁶⁵ Hematoxilina de Harris, Merck, Darmstadt, DE

⁶⁶ Power SYBER® Green Cells-to-Ct™ Kit; Life Technologies, Ambion, CA, USA

⁶⁷ Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA

⁶⁸ Applied Biosystems, Life Technologies, CA, USA

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.

Gene	Primers	Nº acesso
Pr13b1	Forward primer TCCTGTATCGGTGCATGCGCA Reverse primer TCGCGCATTTC AAGACCTTGAGA	NM_012535.2
Tpbpa	Forward primer CTGTGCCTGGGAGTGGCCTCA Reverse primer GGGGAGGCCCTGCTGTTTTT	NM_172073.1
PL-1	Forward primer CCTGGCTGGGAGCCTACACTGT Reverse primer TGGCAGTTGGTTTTGGAGCCA	NM_001083940.2
VEGF	Forward primer GCCCAGACGGGGTGGAGAGT Reverse primer AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA	NM_001110336.1
INF- γ	Forward primer AGTGCTACACGCCGCGTCTT Reverse primer AGTGTGCCTTGGCAGTAACAGCC	NM_138880.2
PGF	Forward primer CCGGCCCTGGCTGCATTGAA Reverse primer CAGGCAAAGCCCACAGGCGA	NM_053595.2
GAPDH	Forward primer GGGGCTCTCTGCTCCCTCCCTGT Reverse primer TGACCCTTTTGGCCCCACCCT	NM_017008.3

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 4X2 (quatro grupos; dois tempos de cultivo) e os valores médios com o desvio padrão dos grupos experimentais foram determinados e foi realizada análise de variância (ANOVA). O teste de *Student Newman Keuls* (SNK) foi utilizado para comparar as médias dos grupos tratados com T3 em relação ao controle. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

RESULTADOS

Diferenciação trofoblástica

Em relação à expressão gênica para Tpbp, gene expresso por células do espongiotrofoblasto, as doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram sua expressão em relação ao grupo controle com 24 e 48 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-4} não alterou a expressão de mRNA para Tpbp em relação ao controle em nenhum dos tempos de cultivo ($P > 0,05$) (Figura 1A).

A dose de 10^{-7} M de T3 aumentou a expressão gênica de Pr13b1, gene expresso pelo trofoblasto invasivo, em relação ao controle com 24 horas de cultivo. As doses de 10^{-4} e 10^{-9} não alteraram a

expressão gênica de Pr13b1 em relação ao controle em nenhum dos tempos de cultivo ($P > 0,05$) (Figura 1A).

Expressão gênica dos fatores pró-angiogênicos VEGF e PGF

A dose de 10^{-7} M de T3 aumentou a expressão gênica de VEGF pelas células trofoblásticas em relação ao controle com 24 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-4} M de T3, pelo contrário, reduziu a expressão de mRNA de VEGF pelas células trofoblásticas em comparação ao grupo controle com 48 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-9} M de T3 não afetou a expressão gênica de VEGF em nenhum dos tempos de cultivo ($P > 0,05$) (Figura 1B).

Em relação ao PGF, as doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram a expressão gênica das células trofoblásticas em relação ao controle com 24 e 48 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-4} M de T3 não afetou a expressão de mRNA de PGF em comparação ao controle em nenhum dos períodos gestacionais ($P > 0,05$) (Figura 1B).

Expressão gênica do mediador inflamatório INF γ

A dose de 10^{-9} M de T3 aumentou a expressão gênica de INF γ pelas células trofoblásticas em relação ao controle com 24 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-7} M de T3 aumentou a expressão gênica de INF γ pelas células trofoblásticas em comparação com controle com 48 horas de cultivo ($P < 0,05$). A dose de 10^{-4} M de T3 não afetou a expressão de mRNA de INF γ em comparação ao controle em nenhum dos períodos gestacionais ($P > 0,05$) (Figura 1C).

Expressão gênica do hormônio PL-1

Com 24 horas de cultivo, as doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram a expressão de mRNA de PL-1 em comparação ao controle, diferente da dose de 10^{-4} M de T3 que reduziu a expressão gênica de PL-1 pelas células trofoblásticas ($P < 0,05$). Com 48 horas de cultivo, a dose de 10^{-7} M de T3 também aumentou a expressão gênica de PL-1 nas células trofoblásticas ($P < 0,05$) (Figura 1C).

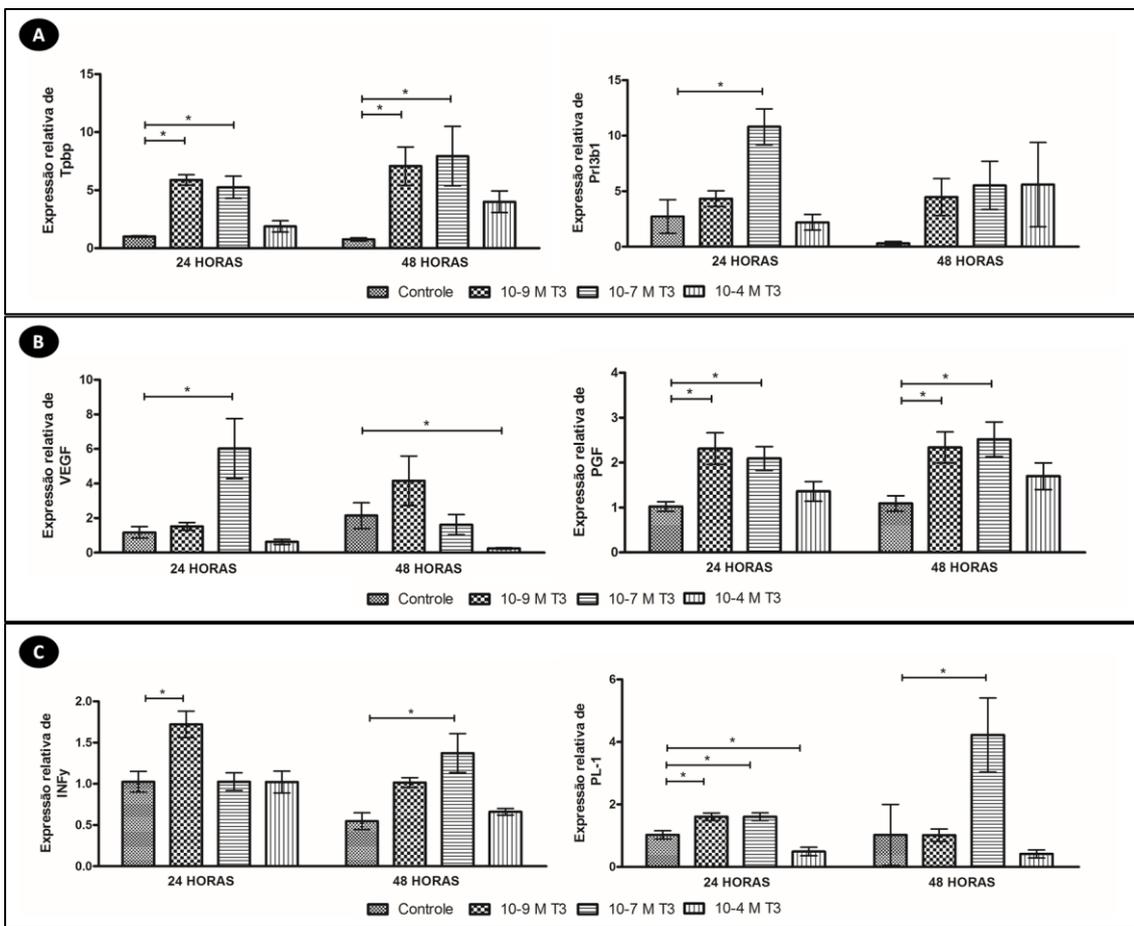


Figura 1. Expressão gênica (média±DP) de Tbp, Prl3b1, VEGF, PGF, INF γ e PL-1 nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10^{-9} M de T3, 10^{-7} M de T3 e 10^{-4} M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo. A) Expressão relativa de transcritos gênicos para Tbp e Prl3b1. B) Expressão relativa de transcritos gênicos para VEGF e PGF. C) Expressão relativa de transcritos gênicos para INF γ e PL-1. (* $P < 0,05$)

DISCUSSÃO

As doses de 10^{-7} e 10^{-9} M de T3 aumentaram a expressão gênica de Tpbp com 24 e 48 horas de cultivo. A dose de 10^{-7} M de T3, considerada uma dose fisiológica (De Vito *et al.*, 2012), aumentou a expressão gênica de Prl3b1 com 24 horas de cultivo. Estes resultados demonstram que a triiodotironina estimula a diferenciação das células trofoblásticas, uma vez que Tpbp e Prl3b1 são genes expressos pelo espongiotrofoblasto e trofoblasto invasivo, respectivamente, durante a diferenciação do cone ectoplacentário (Cross, 2005). Ratas com hipotireoidismo apresentam redução de *c-fos* placentário, gene relacionado à diferenciação trofoblástica (Leonard *et al.*, 1999).

As doses 10^{-7} e/ou 10^{-9} M de T3 também aumentaram a expressão gênica de VEGF, PGF, PL-1 e INF γ com 24 e/ou 48 horas de cultivo, corroborando com os resultados de Maruo *et al.* (1991) que observaram *in vitro* o aumento da produção hormonal em explante placentário humano tratado com as doses de 10^{-7} e 10^{-8} M de T3. O hipotireoidismo materno em ratas causa redução da expressão de VEGF, PGF e INF γ pelo trofoblasto (Silva *et al.*, 2014a; Silva *et*

al., 2014b). A T3 também estimula a produção *in vitro* e *in vivo* de VEGF pelo tecido nervoso (Zhang *et al.*, 2010).

Contudo, a dose de 10^{-4} M de T3 reduziu a expressão de PL-1 e VEGF com 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente, mostrando um efeito negativo de maiores doses de T3 sobre a atividade hormonal e angiogênica da célula trofoblástica. Estes resultados corroboram com Maruo *et al.* (1991) e Nishii *et al.* (1991) que mostraram que 10^{-4} M de T3 *in vitro* reduz a produção de hormônios pelo citotrofoblasto humano. Ratas com hipertireoidismo também apresentam redução da expressão de VEGF placentário no final da gestação (Silva *et al.*, 2014b).

Conclui-se que a triiodotironina estimula a expressão gênica de fatores envolvidos com a diferenciação e a atividade angiogênica, imune e endócrina em células trofoblásticas de camundongo e estes efeitos são dose-dependente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hormônios tireoidianos são fundamentais para a função reprodutiva, de modo que alterações em seus níveis séricos podem resultar em infertilidade tanto na mulher como nos animais domésticos. Os resultados *in vivo* e *in vitro* encontrados neste trabalho mostram que os casos de aborto, restrição do crescimento fetal, natimortalidade observados em ratas com hipotireoidismo e a maior taxa de gestação e parto prematuro observados em ratas hipertireoideas podem ser decorrentes de alterações no perfil de citocinas, hormônios e fatores de crescimento envolvidos na função placentária.

O presente trabalho demonstrou que não somente a expressão de transcritos gênicos como também a expressão proteica de algumas citocinas e fatores de crescimento são alteradas nas disfunções tireoidianas, como a redução da expressão de iNOS e INF γ no hipotireoidismo no meio da gestação e a redução da expressão de VEGF nas ratas tratadas com tiroxina ao final da gestação. Além disso, a imunistoquímica permitiu não somente quantificar a expressão proteica através da morfometria, como também avaliar no disco placentário como ocorria a expressão dos diferentes fatores estudados no espongiotrofoblasto e labirinto placentário. Isto possibilitou, por exemplo, mostrar que há uma expressão diferenciada de VEGF e Flk-1 entre os espongiotrofoblastos e células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto, como também um aumento da expressão proteica de VEGF no espongiotrofoblasto das ratas hipotireoideas, com uma redução concomitante da sua expressão no labirinto placentário.

Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa mostraram que o labirinto placentário de ratas com hipotireoidismo apresenta redução dos vasos fetais e dilatação dos seios venosos maternos, além de redução do peso fetal e placentário. É plausível que estas alterações sejam decorrentes, pelo menos em parte, da redução da expressão dos principais fatores angiogênicos placentários, VEGF e PGF, observado na placenta destes animais, concomitantemente com o aumento do hormônio

rPlf, que tem ação anti-angiogênica. Alterações na vascularização placentária são as principais causas de aborto e restrição de crescimento fetal na mulher e nas espécies animais domésticas, por comprometer o transporte de nutrientes e metabólitos e, conseqüentemente, o desenvolvimento fetal e placentário.

Estudos anteriores também realizados pelo grupo de pesquisa também mostraram que há aumento da população de células de glicogênio e células gigantes trofoblásticas na placenta de ratas com hipotireoidismo, levantando a suspeita de que haja falha da migração destas células em direção a decídua. Nosso trabalho demonstrou que a migração de células trofoblásticas na interface materno-fetal está reduzida nestes animais, o que pode comprometer mais ainda a vascularização uterina, uma vez que a célula trofoblástica ajuda no remodelamento dos vasos sanguíneos maternos. A redução da migração teve como causa não somente a redução das metaloproteinases e leptina placentária por estes animais, como também da citocina inflamatória iNOS, uma vez que a motilidade celular e a invasão trofoblástica *in vitro* são fortemente dependentes da NOS produzida pelo próprio trofoblasto.

Diferente das ratas hipotireoideas, ratas com hipertireoidismo apresentam maior taxa de nascimentos sem afetar o peso fetal. Isto provavelmente pode estar relacionado ao aumento da expressão de lactogênio placentário 1 na placenta destes animais observado no presente trabalho, que é o principal hormônio envolvido no metabolismo e desenvolvimento fetal. As ratas com hipotireoidismo, pelo contrário, apresentaram redução da expressão deste hormônio pela placenta, o que também deve contribuir para a redução do peso fetal que estes animais apresentam.

Contudo, o desenvolvimento fetal e placentário também é dependente do estabelecimento de um ambiente anti-inflamatório apropriado na interface materno-fetal durante a gestação. Vale ressaltar que os processos de vascularização, migração trofoblástica e nutrição do feto sofrem

a influência de mediadores inflamatórios produzidos pela placenta. Por isso, o estudo destes fatores no presente trabalho foi imprescindível para uma melhor compreensão das alterações placentárias e reprodutivas observadas nas disfunções tireoidianas.

Nossos resultados mostraram que a expressão de TLRs é influenciada por alterações endócrinas, pelo fato das ratas hipotireóideas terem apresentado uma redução da expressão de TLR4 e um aumento de TLR2 no disco placentário. Além disso, o estabelecimento de um ambiente anti-inflamatório na placenta destes animais foi comprometido, uma vez que houve redução das principais citocinas anti-inflamatórias, IL10 e iNOS. Nas ratas tratadas com tiroxina, pelo contrário, há aumento no meio da gestação de citocinas anti-inflamatórias na placenta, além de redução de TNF α , uma citocina pró-inflamatória. Todo este perfil imunológico na placenta destes animais contribui para um ambiente anti-inflamatório no meio da gestação. Contudo, é importante ressaltar que um desbalanço na expressão de mediadores inflamatórios na interface materno-fetal pode também favorecer a infecção feto-placentária. Por isso, mais pesquisas avaliando a susceptibilidade de indivíduos com disfunção tireoidiana à infecções feto-placentárias são necessárias, uma vez que o hipotireoidismo é uma das principais endocrinopatias que acometem a mulher durante o período gestacional.

De forma interessante, as ratas com excesso de T4 apresentaram aumento de citocinas inflamatórias no final da gestação, além de uma redução da migração trofoblástica endovascular e da expressão dos fatores angiogênicos VEGF e Flk-1. Acredita-se que todas estas alterações estão envolvidas com o parto prematuro apresentado por estes animais, descrito em outros trabalhos que apresentam uma metodologia semelhante ao do presente trabalho. Para a ocorrência do parto ocorre redução de fatores angiogênicos pela placenta além do estabelecimento de um ambiente inflamatório na interface materno-fetal. Este ambiente inflamatório é indispensável, entre outras funções, para a remoção dos trofoblastos presentes na decídua e liberação da placenta.

Todos os resultados obtidos *in vivo* no presente trabalho corroboraram com os resultados obtidos

in vitro com cultura de células trofoblásticas de camundongo. Inicialmente, a pretensão do trabalho era utilizar cones ectoplacentários de rata, uma vez que todos os nossos resultados e os que constam na literatura a respeito de disfunção tireoidiana são em ratas. Contudo, a dissecação do cone ectoplacentário de ratas para o cultivo é muito difícil, uma vez que o mesmo não é muito visível sob um estereomicroscópio e se desfaz facilmente durante a manipulação. Entretanto, o camundongo também é visto como o principal modelo experimental junto com a rata para o estudo da placentação de humanos, não somente pela similaridade da morfofisiologia placentária como também por apresentarem a expressão dos mesmos genes durante o desenvolvimento placentário.

O presente trabalho mostrou que a triiodotironina em doses fisiológicas estimula a expressão gênica em células trofoblásticas de fatores envolvidos com a diferenciação e a atividade imune, angiogênica e endócrina, sendo que doses maiores apresenta efeito negativo sobre a expressão de VEGF e PL-1. Isso mostra que não somente a deficiência de hormônios tireoidianos como também o excesso pode comprometer a função da célula trofoblástica. Mais pesquisas são necessárias para compreender por que o excesso de hormônio tireoidiano afeta a atividade trofoblástica, se é por um esgotamento das reservas energéticas da célula e/ou por resultar em estresse metabólico, como o estresse oxidativo e/ou do retículo endoplasmático. As principais patologias gestacionais que acometem a mulher como a pré-eclampsia, a restrição de crescimento intrauterino e o aborto apresentam o estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático como as principais causas da perda de função e morte da célula trofoblástica e, conseqüentemente, da disfunção placentária.

Todos os nossos resultados contribuem para o esclarecimento dos possíveis mecanismos pelos quais as disfunções tireoidianas maternas podem comprometer a função placentária e, conseqüentemente, a atividade reprodutiva em mulheres e nos animais domésticos. Por isso, avaliar o perfil sérico dos hormônios tireoidianos durante a gestação e realizar o tratamento quando há alteração é indispensável para o desenvolvimento feto-placentário adequado e o sucesso da gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERDEEN, G.W.; WIEGAND, S.J.; BONAGURA, T.W. *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates the estrogen-induced breakdown of tight junctions between and increase in proliferation of microvessel endothelial cells in the baboon endometrium. *Endocrinology*, v.149, p.6076-6083, 2008.
- ABRAHAMS, V.M.; BOLE-ALDO, P.; KIM, Y.M. *et al.* Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J. Immunol.*, v.173, p.4286-96, 2004.
- ADAMSON, S.L.; LU, Y.; WHITELEY, K.J. *et al.* Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, v.250, p.358-373, 2002.
- ADELMAN, D.M.; GERTSENSTEIN, M.; NAGY, A. *et al.* Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev.*, v.14, p.3191-203, 2000.
- ADRIAN, C.; MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem. Sci.*, v.26, p.390-397, 2001.
- AIN, R.; CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev. Biol.*, v.260, p.176-190, 2003.
- AIN, R.; KONNO, T.; CANHAM, L.N. *et al.* Phenotypic analysis of the rat placenta. *Methods. Mol. Med.*, v.121, p.295-313, 2006.
- AKIRA, S.; HOSHINO, K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J. Infect. Dis.*, v.187, p.S356-63, 2003.
- ALLAN, W.C.; HADDOW, J.E.; PALOMAKI, G.E. *et al.* Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *J. Med. Screen.* v.7, p.127-30, 2000.
- AMIN, M.A.; VOLPERT, O.V.; WOODS, J.M. *et al.* Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ. Res.*, v.93, p.321-9, 2003.
- ANDERLE, C.; HAMMER, A.; POLGÁR, B. *et al.* Human trophoblast cells express the immunomodulator progesterone-induced blocking factor. *J. Reprod. Immunol.*, v.79, p.26-36, 2008.
- ANDRAWEERA, P.H.; DEKKER, G.A.; LAURENCE, J.A. *et al.* Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, v.33, p.467-472, 2012.
- ANDRAWEERA, P.H.; DEKKER, G.A.; ROBERTS, C.T. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum. Reprod. Update.* v.18, p.436-457, 2012.
- ANTHONY, R.V.; SCHEAFFER, A.N.; WRIGHT, C.D. *et al.* Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod. Suppl.*, v.61, p.183-194, 2003.
- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; CARDUCCI, A. *et al.* Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*, v.131, p.175-82, 2006.
- ARMANT, D.R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic development program of trophoblast cells. *Develop. Biol.*, v.280, p.260-280, 2005.
- ASANOMA, K.; RUMI, M.A.; KENT, L.N. *et al.* FGF4-dependent stem cells derived from rat blastocysts differentiate along the trophoblast lineage. *Dev. Biol.*, v.351, p.110-9, 2011.
- ASHKAR, A.A.; DI SANTO, J.P.; CROY, B.A. Interferon γ contributes to initiation of uterine vascular modification decidual integrity and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.* v.192, p.259-69, 2000.

- ATHANASSAKIS, I.; PAPADIMITRIOU, L.; BOURIS, G. *et al.* Interferon-gamma induces differentiation of ectoplacental cone cells to phenotypically distinct trophoblasts. *Dev. Comp. Immunol.*, v.24, p.663-72, 2000.
- BAJORIA, R.; SOORANNA, S.R.; WARD, B.S. *et al.* Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface. *Placenta*, v.23, p.103-15, 2002.
- BAYLESS, K.J.; DAVIS, G.E. Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.312, p.903-913, 2003.
- BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P.A. Invasiveness of mouse trophoblastic cells in connective tissue. *Acta Anat. (Basel)*, v.150, p.246-52, 1994.
- BLOOM, B.R.; BENNETT, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.*, v.153 p.80-2, 1966.
- BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M. *et al.* Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, v.19, p.225-268, 1998.
- BONET, B.; HERRERA, E. Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology.*, v.122, p.450-455, 1988.
- BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; JOHNSON, M.L. *et al.* Placental growth throughout the last two-thirds of pregnancy in sheep: Vascular development and angiogenic factor expression. *Biol. Reprod.*, v.76, p.259-267, 2007.
- BOUILLOT, S.; RAMPON, C.; TILLET, E. *et al.* Tracing the Glycogen Cells with Protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta.*, v.27, p.882-888, 2006.
- BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. Introduction to hypothyroidism. In: BRAVERMAN, L.E. e UTIGER, R.D. (Ed) Werner and Ingbar's the Thyroid. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 719-721.
- BURDON, C.; MANN, C.; CINDROVA-DAVIES, T. *et al.* Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta. *Placenta.*, v.28, p.724-733, 2007.
- BURTON, G.J. Oxygen , the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J. Anat.*, v.215, p.27-35, 2009.
- CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N. *et al.* MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.*, v.377, p.68-71, 1995.
- CALUWAERTS, S.; VERCRUYSE, L.; LUYTEN, C. *et al.* Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta.*, v.26, p.574-84, 2005.
- CALVO, R.; OBREGON, M.J.; DEL REY, F.E. The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal thyroid status. *Endocrinology.*, v.131, p.357-365, 1992.
- CARDAROPOLI, S.; PAULESU, L.; ROMAGNOLI, R. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction. *Clin. Dev. Immunol.*, v.2012, p.1-9, 2012.
- CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.*, v.7, p.575-583, 2001.
- CARTWRIGHT, J.E.; HOLDEN, D.P.; WHITLEY, G.S. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, v.128, p.181-189, 1999.

- CASTILLO, V. Canine hypothyroidism. *Veterinary Focus*, v. 21, n. 1, p.2- 8, 2011.
- CASTILLO, V.; RODRIGUEZ, M.S.; LALIA, J. Estimulación con TRH y evaluación de la respuesta de la TSH en perros. Su importancia en el diagnóstico de la enfermedad tiroidea subclínica (hipotiroidismo subclínico y tiroiditis autoinmune eutiroidea). *Revista Científica*, v. 11, p.35-40, 2001.
- CASTRO, R.D.; SILVA, J.F.; OCARINO, N.M. *et al.* Mielograma de ratas com disfunção tireoidiana. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.63, p.1246-50, 2011.
- CHAKRABORTY, D.; RUMI, M.A.; KONNO, T. *et al.* Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.108, p.16295-300, 2011.
- CHAN, S.; KILBY, M.D. Thyroid hormone and central nervous system development. *J. Endocrinol.*, v.165, p.1-8, 2000.
- CHAOUAT, G.; MENU, E.; MOGNETTI, B. *et al.* Immunopathology of early pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, v.5, p.73-92, 1997.
- CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*, v.25, p.103-113, 2004.
- CHEN, Y.; VOEGELI, T.S.; LIU, P.P. *et al.* Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm. Allergy. Drug. Targets.*, v.6, p.91-100, 2007.
- CHEUNG, C.Y. Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology.*, v.113, p.632-638, 1983.
- CHOKSI, N.Y.; JAHNKE, G.D.; HILAIRE, C.S. *et al.* Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. *Birth. Defects. Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.*, v.68, p.479-491, 2003.
- CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; SHARKEY, A.M. *et al.* Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.*, v.11, p.1090-1098, 1996.
- COAN, P.M.; CONROY, N.; BURTON, G.J. *et al.* Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev. Dyn.*, v.235, p.3280-3294, 2006.
- COLUCCI, F.; BOULENOUAR, S.; KIECKBUSCH, J. *et al.* How does variability of immune system genes affect placentation? *Placenta.*, v.32, p.539-45, 2011.
- CORBACHO, A.M.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinol.*, v.173, p.219-38, 2002.
- CORREIA-DA-SILVA, G.; BELL, S.C.; PRINGLE, J.H. *et al.* Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta.*, v. 25, p. 538-547, 2004.
- COULAM, C.B. Understanding the immunobiology of pregnancy and applying it to treatment of recurrent pregnancy loss. *Early Pregnancy.*, v.4, p.19-29, 2000.
- CRAVEN, C.M.; MORGAN, T.; WARD, K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta.*, v.19, p.241-252, 1998.
- CRONIER, L.; GUIBOURDENCHE, J.; NIGER, C. *et al.* Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta.*, v.20, p.669-76, 1999.
- CROSS, J. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - a review. *Placenta.*, v.26, p.S3-S9, 2005.

- CROSS, J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v.11, p.105-113, 2000.
- CROSS, J.C.; HEMBERGER, M.; LU, Y. *et al.* Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.187, p.207-212, 2002.
- CROY, B.A.; ASHKAR, A.A.; MINHAS, K. *et al.* Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *J. Soc. Gynecol. Investig.*, v.7, p.12-20, 2000.
- CROY, B.A.; CHANTAKRU, S.; ESADEG, S. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *J. Reprod. Immunol.*, v.57, p.151-168, 2002.
- DAI, D.; LITMAN, E.S.; SCHONTEICH, E. Progesterone regulation of activating protein-1 transcriptional activity: a possible mechanism of progesterone inhibition of endometrial cancer cell growth. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.87, p.123-31, 2003.
- DE VITO, P.; BALDUCCI, V.; LEONE, S. *et al.* Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids*, v.77, p.988-95, 2012.
- DELGADO, S.R.; MCBEY, B.A.; YAMASHIRO, S. *et al.* Accounting for the parturition loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leukoc. Biol.*, v.59, p.262-269, 1996.
- DIXON, R.M.; REID, S.W.J.; MOONEY, C.T. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet. Rec.*, v.145, p.481-487, 1999.
- DOUGLAS, N.C.; TANG, H.; GOMEZ, R. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinology*, v.150, p.3845-3854, 2009.
- DUPRESSOIR, A.; MARCEAU, G.; VERNOCHE, C. *et al.* Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.725-730, 2005.
- DUPRESSOIR, A.; VERNOCHE, C.; BAWA, O. *et al.* Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.106, p.12127-12132, 2009.
- EVANS, K.W.; FARWELL, A.P.; BRAVERMAN, L.E. Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, v.113, p.1459-1463, 1983.
- FARIA, M.R.; HOSHIDA, M.S.; FERRO, E.A. *et al.* Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.8, p.95, 2010.
- FAXEN, M.; NASIELL, J.; LUNELL, N.O. *et al.* Differences in RNAm expression of endothelin-1, c-fos and c-jun in placentas from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. *Gynecol. Obstet. Invest.*, v.44, p.93-96, 1997.
- FELDKAMP, J. Subclinical hyperthyroidism. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, v.138, p.2146-50, 2013.
- FLO, T.H.; RYAN, L.; LATZ, E. *et al.* Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.35489-95, 2002.
- FRANK, N.; SOJKA, J.; MESSER, N.T. Equine thyroid dysfunction. *Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.*, v.18, p.305-319, 2002.
- FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. The physiology of reproduction. New York: Raven Press. 1994. p.1893-1928.

- FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. The physiology of reproduction. New York: Raven Press. 1988. p.1893-1928.
- FREITAS, E.S.; LEITE, E.D.; SOUZA, C.A. *et al.* Histomorphometry and Expressions of Cdc47 and Caspase-3 in Hyperthyroid Rats Uteri and Placentas during Gestation and Postpartum Associated with Fetal Development. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.19, p.498-509, 2007.
- GALTON, V.A.; MARTINEZ, E.; HERNANDEZ, A. *et al.* The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*, v. 142, p.2123-2128, 2001.
- GAMBINO, Y.P.; MAYMÓ, J.L.; PÉREZ PÉREZ, A. *et al.* Elsevier Trophoblast Research Award lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *Placenta*, v.33, p.S63-70, 2012.
- GAMBINO, Y.P.; MAYMÓ, J.L.; PÉREZ-PÉREZ, A. *et al.* 17Beta-estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. *Biol. Reprod.*, v.83, p.42-51, 2010.
- GEKAS, C.; DIETERLEN-LIÈVRE, F.; ORKIN, S.H. *et al.* The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev. Cell.*, v.8, 365-375, 2005.
- GEORGIADES, P.; WATKINS, M.; BURTON, G.J. *et al.* Roles for genomic imprinting and the zygote genome in placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.98, p.4522-4527, 2001.
- GEVA, E.; JAFFE, R.B. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet. Gynecol. Surv.*, v.55, p.511-519, 2000.
- GOMES, M.G.; SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.F.C. *et al.* Apoptose, proliferação e histomorfometria do baço de ratas adultas com hipofunção tireoidiana e ovariana. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.52, p.1031-8, 2008.
- GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, v.111, p.927-30, 2002.
- GUILLOMOT, M.; FLÉCHON, J.E.; LEROY, E. Blastocyst development and implantation. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. (Ed) Reproduction in Mammals and Man. Paris: Ellipses, 1993, p.387-412.
- GUIMOND, M.J.; LUROSS, J.A.; WANG, B. *et al.* Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol. Reprod.*, v.56, p.169-79, 1997.
- HAMMER, A. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.*, v.90, p.21-8, 2011.
- HAPON, M.B.; SIMONCINI, M.; VIA, G. *et al.* Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction.*, v.126, p.371-382, 2003.
- HARVEY, C.B., WILLIAMS, G.R. Mechanism of thyroid action. *Thyroid*, v.12, p.441-446, 2002.
- HATSUTA, M.; ABE, K.; TAMURA, K. *et al.* Effects of hypothyroidism on the estrus cycle and reproductive hormones in mature female rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.486, p.343-348, 2004.
- HAYAKAWA, S.; WATANABE, K.; SATOH, K. Increased apoptosis and repair hyperplasia in preclamptic placenta. *Placenta.*, v.16, p.2, 1995.
- HE, H.; VENEMA, V.J.; GU, X. *et al.* Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.25130-5, 1999.
- HEMBERGER, M.; CROSS, J.C. Genes governing placental development. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.12, p.162-168, 2001.
- HENDRICH, C.E.; PORTERFIELD, S.P. Serum growth hormone levels in hypothyroid and GH-treated thyroidectomized rats and their progenies.

- Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.201, p.296-302, 1992.
- HENSON, M.C.; CASTRACANE, V.D. Leptin in pregnancy: an update. *Biol. Reprod.*, v.74, p.218-29, 2006.
- HENSON, M.C.; SWAN, K.F.; O'NEIL, J.S. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet. Gynecol.*, v.92, p.1020-1028, 1998.
- HIRASHIMA, M.; LU, Y.; BYERS, L. *et al.* Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.100, p.15637-15642, 2003.
- HOLMLUND, U.; CEBERS, G.; DAHLFORS, A.R. *et al.* Expression and regulation of the pattern recognition receptors Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in the human placenta. *Immunology.*, v.107, p.145-51, 2002.
- HOLMLUND, U.; WÄHÄMAA, H.; BACHMAYER, N. *et al.* The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology.*, v.122, p.430-7, 2007.
- HOSHIDA, M.S.; GORJÃO, R.; LIMA, C. *et al.* Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. *Placenta.*, v.28, p.1059-1072, 2007.
- HOUDEAU, E.; MORIEZ, R.; LEVEQUE, M. *et al.* Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, v.132, p.982-93, 2007.
- HU, D.; CROSS, J.C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.*, v.54, p.341-54, 2010.
- HU, Y.; DUTZ, J.P.; MACCALMAN, C.D. *et al.* Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. *J. Immunol.* v.177, p.8522-8530, 2006.
- HUANG, A.; SUN, D.; KOLLER, A. *et al.* 17 Beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation*, v.101, p.94-100, 2000.
- HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J.C.P. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.195, p.29-39, 2006.
- IDRIS, I.; SRINIVASAN, R.; SIMM, A. *et al.* Maternal hypothyroidism in early and late gestation: effects on neonatal and obstetric outcome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, v.63, p.560-565, 2005.
- IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R. *et al.* 17{beta}-Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.298, p.E411-8, 2010.
- IETTA, F.; WU, Y.; ROMAGNOLI, R. *et al.* Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.292, p.E272-E280, 2007.
- IMAKAWA, K.; CHANG, K.; CHRISTENSON, R.K. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *J. Reprod. Dev.*, v.50, p.155-169, 2004.
- INHASZ, K.A.C.; WOODSIDE, B.; SINZATO, Y.K. *et al.* Neonatally induced mild diabetes: influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. *Diabetol. Metab.*, v.5, p. 61, 2013.
- JABBOUR, H.N.; SALES, K.J.; SMITH, O.P. *et al.* Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.252, p.191-200, 2006.
- JACKSON, D.; VOLPERT, O.V.; BOUCK, N. *et al.* Stimulation and inhibition of angiogenesis by 'placental proliferin and proliferin-related protein. *Science.*, v.266, 1581-1584, 1994.
- JACKSON, M.R.; CARNEY, E.W.; LYE, S.J. *et al.* Localization of two angiogenic growth factors

- (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta.*, v.15, p.341-353, 1994.
- JAHNKE, G.; NICHOLSON, G.; GREELEY, G.H. *et al.* Studies of the neural mechanisms by which hypothyroidism decreases prolactin secretion in the rat. *Brain. Research.*, v.191, p.429-441, 1980.
- JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Gestação fisiologia pr -natal e parto. In: HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal, 4.ed, São Paulo: Manole, 1982, p.280-321.
- JAMES, S.R.; FRANKLYN, J.A.; KILBY, M.D. Placental transport of thyroid hormone. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 21, p.253-264, 2007.
- JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. *et al.* Effects of estradiol-17 β on expression of RNAm for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine.*, v.30, p.333-342, 2006.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. (Ed.) Histologia básica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995, p.367-388.
- KANEKO, J.J. Thyroid function. In: KANEKO, J.J. (ed). Clinical biochemistry of domestic animals. New York: Academic Press, 1989, p. 634-635.
- KARABINAS, C.D.; TOLIS, G.J. Thyroid disorders and pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.*, v.18, p.509-515, 1998.
- KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, v.69, p.1-7, 2003.
- KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.*, v.25, p.114-126, 2004.
- KEKLIK, M.; KAYNAR, L.; YILMAZ, M. *et al.* The results of therapeutic plasma exchange in patients with severe hyperthyroidism: a retrospective multicenter study. *Transfus. Apher. Sci.*, v.48, p.327-30, 2013.
- KILBY, M.D.; VERHAEG, J.; GITTOES, N. *et al.* Circulating thyroid hormone concentrations and placental thyroid hormone receptor expression in normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.83, p.2964-71, 1998.
- KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K. *et al.* Interferon- γ promotes abortion due to Brucella infection in pregnancy mice. *BMC Microbiol.*, v.5, p.22, 2005.
- KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Dev. Biol.*, v.54, p.269-80, 2010.
- KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v.35, p.191-202, 2009.
- KOGA, K.; MOR G. Toll-like receptors and pregnancy. *Reprod. Sci.*, v.14, p.297-299, 2007.
- KOGA, K.; MOR, G. Toll-Like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.63, p.587-600, 2010.
- KONNO, T.; REMPEL, L.A.; ARROYO, J.A. *et al.* Pregnancy in the brown Norway rat: a model for investigating the genetics of placentation. *Biol. Reprod.*, v.76, p.709-18, 2007.
- KRAMER, B.W.; KAEMMERER, U.; KAPP, M. *et al.* Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatr. Res.*, v.58, p.607-612, 2005.
- KRASSAS, G.E. Thyroid disease and female reproduction. *Fertil. Steril.*, v.74, p.1063-1070, 2000.

- LALA, P.K.; CHAKRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*, v 24, p.575-87, 2003.
- LEANZA, E.C.; HOSHIDA, M.S.; COSTA, A.F. *et al.* Signaling molecules involved in IFN-gamma-inducible nitric oxide synthase expression in the mouse trophoblast. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.58, p.537-46, 2007.
- LEONARD, A. J.; PICKARD, M.R.; SINHA, A.K. *et al.* Maternal thyroid dysfunction and c-fos and c-jun expression in rat placenta. *Placenta*, v.20, p.727-731, 1999.
- LEONARD, J.L.; KOEHRLE, J. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (ed). *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8 ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.136-173.
- LINZER, D.I.; FISHER, S.J. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol. Endocrinol.*, v.13, p.837-840, 1999.
- LONGCOPE, C. The male and female reproductive systems in hypothyroidism. In: BRAVERMAN, L.E. (Ed.) *The Thyroid: A fundamental and Clinical Text*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott, 1991, p.1052-1055.
- LUTHER, J.; AITKEN, R.; MILNE, J. *et al.* Maternal and fetal growth, body composition, endocrinology, and metabolic status in undernourished adolescent sheep. *Biol. Reprod.*, v.77, p.343-350, 2007.
- MACCHIARELLI, G.; PALMERINI, M.G.; NOTTOLA, S.A. *et al.* Restoration of corpus luteum angiogenesis in immature hypothyroid rdw rats after thyroxine treatment: morphologic and molecular evidence. *Theriogenology.*, v.79, p.116-126, 2013.
- MALASSINÉ, A.; CRONIER, L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*, v.19, p.3-11, 2002.
- MALASSINÉ, A.; FRENDON, J.L.; EVAINBRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update*, v.9, p.531-539, 2003.
- MALTEPE, E.; KRAMPITZ, G.W.; OKAZAKI, K.M. *et al.* Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development*, v.132, p.3393-403, 2005.
- MANN, C.A.; HEMPSTOCK, J.; CHARNOCK-JONES, D.S. *et al.* Oxidative stress and apoptosis in the labyrinth of the normal mouse placenta increase with gestational age. *Placenta*, v.24, p.21, 2003.
- MANN, P.E.; BRIDGES, R.S. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Prog. Brain. Res.*, v.133, p.251-62, 2001.
- MARCONDES, F.K.; VANDERLEI, L.C.M.; LANZA, L.L.B. *et al.* Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v. 74, p.663-669, 1996.
- MARUO, T.; HAYASHI, M.; MATSUO, H. *et al.* The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, v.121, p.1233-1241, 1987.
- MARUO, T.; MATSUO, H.; MOCHIZUKI, M. Thyroid hormone as a biological amplifier of differentiated trophoblast function in early pregnancy. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*, v.125, p.58-66, 1991.
- MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N. *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.*, v.3, p.1029-33, 1997.
- MATZINGER, P. An innate sense of danger. *Ann. NY Acad. Sci.* v.961, p.341-342, 2002.
- MAURO, T.; KATAYAMA, K.; BARNEA, E.R. *et al.* A role for thyroid hormone in the induction of ovulation and corpus luteum function. *Horm. Res.*, v.37, p.12-18, 1992.

- MAYNARD, S.E.; MIN, J.Y.; MERCHAN, J. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sflt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.*, v.111, p.649-658, 2003.
- MI, S.; LEE, X.; LI, X. *et al.* Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, v.403, p.785-789, 2000.
- MIKO, E.; HALASZ, M.; JERICEVIC-MULAC, B. *et al.* Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *J. Reprod. Immunol.*, v.90, p.50-57, 2011.
- MILLER, L.; ALLEY, E.W.; MURPHY, W.J. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, v.59, p.442-50, 1996.
- MILSTONE, D.S.; REDLINE, R.W.; O'DONNELL, P.E. *et al.* E-selectin expression and function in a unique placental trophoblast population at the fetal- maternal interface: regulation by a trophoblast-restricted transcriptional mechanism conserved between humans and mice. *Dev. Dyn.*, v.219, p.63-76, 2000.
- MONTUENGA, L.M.; MARTINEZ, A.; MILLER, M.J. *et al.* Expression of adrenomedullin and its receptor during embryogenesis suggests autocrine or paracrine modes of action. *Endocrinology*, v.138, p.440-451, 1997.
- MORREALE DE ESCOBAR, G.; PASTOR, R.; OBREGÓN, M.J. *et al.* Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*, v.117, p.1890-1900, 1985.
- MORRISH, D.W.; DAKOUR, J.; LI, H. *et al.* In vitro cultured human term cytotrophoblast: a model for normal primary epithelial cells demonstrating a spontaneous differentiation programme that requires EGF for extensive development of syncytium. *Placenta*, v.18, p.577-885, 1997.
- MUKKU, V.R.; KIRKLAND, J.L.; HARDY, M. *et al.* Evidence for thyroid hormone receptors in uterine nuclei. *Metabolism*. v.32, p.142-145, 1983.
- MURPHY, S.P.; CHOI, J.C.; HOLTZ, R. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression in trophoblast cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.2, p.52-9, 2004.
- NAKAO, N.; ONO, H.; YOSHIMURA, T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction*, v.136, p.1-8, 2008.
- NAVAS, P.B.; MOTTA, A.B.; HAPON, M.B. *et al.* Hyperthyroidism advances luteolysis in the pregnant rat through changes in prostaglandin balance. *Fertil. Steril.*, v.96, p.1008-14, 2011.
- NI, X.; NICHOLSON, R.C.; KING, B.R. *et al.* Estrogen represses whereas the estrogen-antagonist ICI 182780 stimulates placental CRH gene expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, p.3774-3778, 2002.
- NISHII, H.; ASHITAKA, Y.; MARUO, M. *et al.* Studies on the effect of thyroid hormone and epidermal growth factor on the cultured human cytotrophoblast. *Endocrinol. Jpn.*, v.38, p.279-86, 1991.
- NISWENDER, G.D.; JUENGEL, J.L.; MCGUIRE, W.J. *et al.* Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, v.50, p.239-247, 1994.
- OBREGÓN, M.J.; CALVO, R.M.; DEL REY, F.E. *et al.* Ontogenesis of thyroid function and interactions with maternal function. *Endocr. Dev.*, v.10, p.86-98, 2007.
- OBREGÓN, M.J.; MALLOL, J.; PASTOR, R. *et al.* L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*, v.114, p.305-7, 1984.
- ODA, M.; SHIOTA, K.; TANAKA, S. Trophoblast stem cells. *Methods. Enzymol.*, v.419, p.387-400, 2006.

- OKI, N.; MATSUO, H.; NAKAGO, S. *et al.* Effects of 3,5,3'-Triiodothyronine on the invasive potential and the expression of the integrins and matrix metalloproteinases in cultured early placental extravillous trophoblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.89, p.5213-5221, 2004.
- PICKARD, M.R.; LEONARD, A.J.; OGILVIE, L.M. *et al.* Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise. *J. Endocrinol.*, v.176, p.247-255, 2003.
- PICKARD, M.R.; SINHA, A.K.; OGILVIE, L. *et al.* Maternal hypothyroxinemia influences glucose transporter expression in fetal brain and placenta. *J. Endocrinol.*, v.163, p.385-394, 1999.
- PIOSIK, P.A.; VAN GROENIGEN, M.; VAN DOORN, J. Effects of maternal thyroid status on thyroid hormones and growth in congenitally hypothyroid goat fetuses during the second half of gestation. *Endocrinology*, v.138, p.5-11, 1997.
- PLAISIER, M.; DENNERT, I.; ROST, E. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Hum. Reprod.*, v.24, p.185-197, 2009.
- PLAISIER, M.; RODRIGUES, S.; WILLEMS, F. Different degrees of vascularisation and their relation to the expression of VEGF, PIGF, angiopoietins and their receptors in first-trimester decidua. *Fertil. Steril.*, v.88, p.176-187, 2007.
- POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Hum. Reprod. Update.*, v.9, n. 2, p.149-161, 2003.
- PORTERFIELD, S.P.; WHITTLE, E.; HENDRICH, C.E. Hypoglycemia and glycogen deficits in fetuses of hypothyroid pregnant rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.149, p.748-753, 1975.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today.*, v.18, p.478-82, 1997.
- RAMA, S.; PETRUSZ, P.; RAO, A.J. Hormonal regulation of human trophoblast differentiation: a possible role for 17beta-estradiol and GnRH. *Mol. Cell. Endocrinol.*; v.218, p.79-94, 2004.
- RAMPON, C.; PRANDINI, M.H.; BOULLOT, S. *et al.* Protocadherin 12 (VEcadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Exp. Cell. Res.*, v.302, p.48-60, 2005.
- REDMER, D.A.; AITKEN, R.P.; MILNE, J.S. *et al.* Influence of maternal nutrition on messenger rna expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid-gestation in adolescent sheep. *Biol. Reprod.*, v.72, p.1004-1009, 2005.
- REYMOND, M.J.; BENOTTO, W.; LEMARCHAND-BERAUD, T. The secretory activity of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons is modulated by the thyroid status in the adult rat: consequence on prolactin secretion. *Neuroendocrinology*, v.46, p.62-68, 1987.
- REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S. *et al.* Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.*, v.54, p.355-365, 2010.
- REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; VONNAHME, K.A. *et al.* Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, v.26, p.689-708, 2005.
- REYNOLDS, L.P.; CATON, J.S.; REDMER, D.A. *et al.* Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J. Physiol.*, v.572, p.51-58, 2006.
- REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1671-1681, 1998.
- RIDDLE, O.; BATES, R.W.; DYKSHORN, S.W. The preparation, identification and assay of prolactin- a hormone of the anterior pituitary. *Am.J. Physiol.*, v.105, p.191-216, 1933.

- ROBBINS, J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (Ed.). *Werner and Ingbar's, the thyroid*. 8 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.105-120.
- ROBINS, J.C.; HEIZER, A.; HARDIMAN, A. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta*, v.28, p.1141-6, 2007.
- ROBY, K.F.; SOARES, M.J. Trophoblast cell differentiation and organization: role of fetal and ovarian signals. *Placenta*, v.14, p.529-45, 1993.
- ROGERS, P.A.; ABBERTON, K.M. Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. *Microsc. Res. Tech.*, v.60, p.412-419, 2003.
- ROMERO GUTIÉRREZ, G.; RÍOS LÓPEZ, J.C.; CORTÉS SALIM, P. *et al.* Risk factors associated with dystocic delivery. *Ginecol. Obstet. Mex.*, v.75, p.533-8, 2007.
- ROSARIO, G.X.; AIN, R.; KONNO, T. *et al.* Intrauterine fate of invasive trophoblast cells. *Placenta*, v.30, p.457-63, 2009.
- ROSARIO, G.X.; KONNO, T.; SOARES, M.J. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Dev. Biol.*, v.314, p.362-75, 2008.
- ROSATO, R.R.; GIMENEZ, M.S.; JAHN, G.A. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta. Endocrinol. (Copenh)*, v.127, p.547-54, 1992.
- ROSATO, R.R.; JAMMES, H.; JAHN, G.A. Effect of chronic thyroxine treatment on pregnancy in rats: effects on oestrogen, progesterone, prolactin and GH receptors in uterus, liver and mammary gland. *Endocr. Res.*, v.24, p.269-284, 1998.
- ROSS, D.S. Subclinical hypothyroidism. In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (Ed.) *Werner and Ingbar's, the thyroid*. 8 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.1001-1007.
- ROTHCHILD, I. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog. Horm. Res.*, v.37, p.183-298, 1981.
- RUSS, A.P.; WATTLER, S.; COLLEDJE, W.D. *et al.* Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*, v.404, p.95-99, 2000.
- SAGAWA, N.; YURA, S.; ITOH, H. *et al.* Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. *Endocrine*, v.19, p.65-71, 2002.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 3 ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 264p, 2007.
- SCANLON, M.F.; TOFT, A.D. Regulation of thyrotropin secretion In: BRAVERMAN, L.E.; UTIGER, R.D. (Ed.) *Werner and Ingbar's, the thyroid*. 8 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p.234-253.
- SCHATZ, F.; LOCKWOOD, C.J. Progesterin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.77, p.621-5, 1993.
- SCHWARTZ, N.B. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am. J. Physiol.*, v.107, p.1251-1259, 1964.
- SCOTT-MONCRIEFF, J.C. Thyroid disorders in the geriatric veterinary patient. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v.42, p.707-25, 2012.
- SEIDENSPINNER, T.; TETENS, J.; HABIER, D. *et al.* The placental growth factor (PGF)- a positional and functional candidate gene influencing calving ease and stillbirth in German dairy cattle. *Anim. Genet.*, v.42, p.22-27, 2011.
- SEÑARÍS, R.; GARCIA-CABALLERO, T.; CASABIELL, X. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, v.138, p.4501-4504, 1997.

- SENTMAN, C.L.; MEADOWS, S.K.; WIRA, C.R. *et al.* Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J. Immunol.*, v.173, p.6760-6766, 2004.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E.F. *et al.* Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireoideas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.45, p.258-264, 2001.
- SHAFRIR, E.; BARASH, V.; ZEDERMAN, R. *et al.* Modulation of fetal and placental metabolic pathways in response to maternal thyroid and glucocorticoid hormone excess. *Isr. J. Med. Sci.*, v. 30, p. 32-41, 1994.
- SHERER, D.M.; ABULAFIA O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta.*, v.22, p.1-13, 2001.
- SHIMONOVITZ, S.; HURWITZ, A.; HOCHNER-CELNIKIER, D. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: downregulation by progesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.178, p.457-61, 1998.
- SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T.S. *et al.* Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireoideas em metaestro-diestro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.56, p.628-39, 2004.
- SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Luteal activity of pregnant rats with hypo-and hyperthyroidism. *J. Ovarian. Res.*, v.7, p.75-88, 2014.
- SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. *Reproduction.*, v.147, p.803-816, 2014.
- SILVA, J.F.; VIDIGAL, P.N.; GALVÃO, D.D. *et al.* Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reprod. Fert. Develop.*, v 24, p.923-31, 2012.
- SIMMONS, D.G.; RAWN, S.; DAVIES, A. *et al.* Spatial and temporal expression of the 23 murine Prolactin/Placental Lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. *BMC Genomics*, v.9, p.352, 2008.
- SMITH, G.C.S.; WEAR, H. The perinatal implications of angiogenic factors. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, v.21, p.111-116, 2009.
- SMITH, M.S.; FREEMAN, M.E.; NEILL, J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.*, v.96, p.219-226, 1975.
- SMITH, S.C.; BAKER, P.N.; SYMONDS, E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.177, p.57-65, 1997.
- SMITH, S.K. Angiogenesis and implantation. *Hum. Reprod.*, v.15, p.59-66, 2000.
- SOARES, M.J.; CHAKRABORTY, D.; KARIM RUMI, M.A. *et al.* Rat placentation: an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, v.33, p.233-43, 2012.
- SORENSEN, R.L.; BRELJE, T.C. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm. Metab. Res.*, v.29, p.301-7, 1997.
- SOUZA, C.A.; OCARINO, N.M.; SILVA, J.F. *et al.* Administration of thyroxine affects the morphometric parameters and VEGF expression in the uterus and placenta and the uterine vascularization but does not affect reproductive parameters in gilts during early gestation. *Reprod. Domest. Anim.*, v.46, p.e7-e16, 2011.
- SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A. *et al.* Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, v.83, p.537-50, 2004.
- SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. *et al.* Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of

- progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.19, p.65-78, 2007.
- SRIVASTAVA, M.D.; THOMAS, A.; SRIVASTAVA, B.I. *et al.* Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk. Lymphoma.*, v.48, p.1610-1617, 2007.
- STAGNARO-GREEN, A. Overt hyperthyroidism and hypothyroidism during pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.54, p.478-87, 2011.
- STRADTMAN, E.W. Thyroid dysfunction and ovulatory disorders. In: CARR, B.R.; BLACKWELL, R.E. (Ed.). *Textbook of Reproductive Medicine*. Norwalk:Appleton, 1993, p. 297-321.
- STYNE, D.M. Puberty. In: GREENSPAN, F.S. (Ed), *Basic and Clinical Endocrinology*. London: Appleton, Lange & Norwalk, 1991, p.519-542.
- SUGAWARA, A.; ITO, S. Stimulatory effects of angiotensin II on angiogenesis. *Nippon. Rinsho.*, v.64, p.67-69, 2006.
- SZEKERES-BARTHO, J.; KILAR, F.; FALKAY, G. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyctocytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, v.9, p.15-18, 1985.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect. Dis.*, v.54, p.209-219, 2001.
- TANAKA, S.; KUNATH, T.; HADJANTONAKIS, A.K. *et al.* Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, v.282, p.2072-2075, 1998.
- TANI, Y.; MORI, Y.; MIURA, Y. *et al.* Molecular cloning of the rat thyroxine-binding globulin gene and analysis of its promoter activity. *Endocrinology*, v.135, p.2731-2736, 1994.
- TANTBIROJN, P.; CRUM, C.P.; PARAST, M.M. Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast. *Placenta*, v.29, p.639-45, 2008.
- TELLERIA, C.M.; ZHONG, L.; DEB, S. *et al.* Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology*, v.139, p.2432-42, 1998.
- THADHANI, R.; MUTTER, W.P.; WOLF, M. *et al.* First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.89, p.770-775, 2004.
- TODER, V.; FEIN, A.; CARP, H. *et al.* TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.20, p.73-81, 2003.
- TODER, V.; FEIN, A.; CARP, H. *et al.* TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.20, p.73-81, 2003.
- TODROS, T.; BONTEMPO, S.; PICCOLI, E. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v.123, p.162-166, 2005.
- TOFT, D.J.; LINZER, D.I. Identification of three prolactin-related hormones as markers of invasive trophoblasts in the rat. *Biol. Reprod.*, v.63, p.519-525, 2000.
- TORRY, D.S.; HINRICHS, M.; TORRY, R.J. Determinants of placental vascularity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.51, p.257-268, 2004.
- VALLE, G.R.; FÓSCOLO, C. Falhas reprodutivas e seu tratamento em cães – relato de casos. *Clínica Veterinária*, n.99, o.34-48, 2012.
- VARANOU, A.; WITHINGTON, S.L.; LAKASING, L. The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. *J. Mol. Med.*, v.84, p.305-317, 2006.

- VASUDEVAN, N.; OGAWA, S.; PFAFF, D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol. Rev.*, v.82, p.923-944, 2002.
- VERJANS, E.; NOETZEL, E.; BEKTAS, N. *et al.* Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*, v.9, p.230, 2009.
- VERSLOOT, P.M.; SCHROEDER-VAN DER ELST, J.P.; VAN DER HEIDE, D. *et al.* Effects of marginal iodine deficiency during pregnancy: iodine uptake by the maternal and fetal thyroid. *Am. J. Physiol.*, v.273, p.E1121-E1126, 1997.
- VIGANÒ, P.; CINTORINO, M.; SCHATZ, F. *et al.* The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin. Immunopathol.*, v.29, p.135-50, 2007.
- VON DADELSZEN, P.; MAGEE, L.A. Could an infectious trigger explain the differential maternal response to the shared placental pathology of preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction? *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, v.81, p.642-648, 2002.
- VONNAHME, K.A.; EVONIUK, J.; JOHNSON, M.L. *et al.* Placental vascularity and growth factor expression in singleton, twin, and triplet pregnancies in the sheep. *Endocrine*, v.33, p.53-61, 2008.
- VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. Conceptus competition for uterine space: Different strategies exhibited by the Meishan and Yorkshire pig. *J. Anim. Sci.*, v.80, p.1311-1316, 2002.
- VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E.; FORD, S.P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biol. Reprod.*, v.64, p.1821-1825, 2001.
- VONNAHME, K.A.; ZHU, M.J.; BOROWICZ, P.P. *et al.* Effect of early gestational undernutrition on angiogenic factor expression and vascularity in the bovine placentome. *J. Anim. Sci.*, v.85, 2464-2472, 2007.
- VOSS, A.K.; THOMAS, T.; GRUSS, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, v.127, p.1-11, 2000.
- VUORELA, P.; CARPEN, O.; TULPPALA, M. *et al.* VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.*, v.6, p.276-282, 2000.
- VUORELA, P.; HATVA, E.; LYMBOUSSAKI, A. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in human placenta. *Biol. Reprod.*, v.56, p.489-494, 1997.
- WALLACE, J.M.; REGNAULT, T.R.; LIMESAND, S.W. *et al.* Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *J. Physiol.*, v.565, p.19-26, 2005.
- WATSON, E.D.; CROSS, J.C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*, v.20, p.180-193, 2005.
- WEGMANN, T.G.; GUILBERT, L.J. Immune signalling at the maternal-fetal interface and trophoblast differentiation. *Dev. Comp. Immunol.*, v.16, p.425-30, 1992.
- WEINBERG, E.D. Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microb. Pathog.*, v.3, p.393-397, 1987.
- WEITLAUF, H.M. Biology of implantation. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Ed.) *The Physiology of Reproduction*. 2. ed. New York: Raven Press, 1994, p.391-440.
- WOODING, F.B.P.; FLINT, A.P.F. Placentation. In: LAMMING, G.E. (Ed.). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4 ed. New York: Chapman and Hall, 1994, p.233-460.
- XIE, F.; TURVEY, S.E.; WILLIAMS, M.A. *et al.* Toll-like receptor signaling and pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.63, p.7-16, 2010.
- YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H. *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.*, v.4, p.1144-50, 2003.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W. *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, v.407, p.242-248, 2000.

YANG, Z.Z.; TSCHOPP, O.; HEMMINGS-MIESZCZAK, M. *et al.* Protein kinase Ba/ Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.32124-32131, 2003.

YASHWANTH, R.; RAMA, S.; ANBALAGAN, M. *et al.* Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: a study using human placental and rat Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.246, p.114-120, 2006.

YOTSUMOTO, S.; SHIMADA, T.; CUI, C.Y. *et al.* Expression of adrenomedullin, a hypotensive

peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse. *Dev. Biol.*, v.203, p.264-275, 1998.

YOUNG, W.C.; BOLING, J.L.; BLANDAUI, R. The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *Anat. Rec.*, v.80, p.37-45, 1941.

ZHANG, J.; SUN, R.; WEI, H. *et al.* Toll-like receptor 3 agonist enhances IFN-gamma and TNF-alpha production by murine uterine NK cells. *Int. Immunopharmacol.*, v.7, p.588-596, 2007.

Zhang, L.; Cooper-Kuhn, C.M.; Nannmark, U. *et al.* Stimulatory effects of thyroid hormone on brain angiogenesis in vivo and in vitro. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, v.30, p.323-35, 2010.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 268/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Efeitos in vitro e in vivo dos hormônios tireoidianos na diferenciação e na cinética de migração das células trofoblásticas e na atividade endócrina, angiogênica e imune da placenta*", que tem como responsável(is) **Rogéria Serakides**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 03/2012**.

Este certificado expira-se em **14/ 03/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 268/2011**, related to the project entitled "*Effects in vitro and in vivo of thyroid hormones in the differentiation and migration kinetics of trophoblast cells and endocrine, angiogenic and immune activity from the placenta*", under the supervisors of **Rogéria Serakides**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 16 de Março de 2012.

Prof^ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod Cert. v1.0)

ANEXO 2

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de T3 livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
0 dias de gestação	2,34±0,29 A	1,85±0,19 B	2,63±0,28 A
19 dias de gestação	1,76±0,28 A	1,18±0,15 B	1,98±0,55 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de T4 livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
0 dias de gestação	1,20±0,12 B	0,44±0,09 C	4,73±0,89 A
19 dias de gestação	0,79±0,17 B	0,10±0,08 C	2,46±0,64 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 3. Área de expressão imunistoquímica de INF γ em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,32±0,81 A	2,46±0,92 B	3,62±0,36 A
Labirinto placentário	4,68±0,83 A	5,94±0,58 A	5,28±1,08 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4. Densidade integrada da expressão imunistoquímica de INF γ em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	5,11±1,08 A	3,91±1,31 B	5,54±0,44 A
Labirinto placentário	6,85±0,91 A	8,14±0,84 A	7,48±1,29 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 5. Área de expressão imunistoquímica de INF γ em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,15±0,54 A	2,28±0,68 B	3,52±0,75 A
Labirinto placentário	3,42±0,79 B	3,31±0,55 B	4,60±0,42 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 6. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de INF γ em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	4,91 \pm 0,77 A	3,56 \pm 1,10 B	5,58 \pm 1,18 A
Labirinto placentário	5,37 \pm 1,19 B	5,17 \pm 0,81 B	7,01 \pm 0,61 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 7. Área de expressão imunoistoquímica de MIF em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,86 \pm 0,55 B	4,78 \pm 0,39 A	4,62 \pm 0,33 A
Labirinto placentário	4,76 \pm 1,43 A	4,79 \pm 0,42 A	4,62 \pm 1,22 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 8. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de MIF em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	6,00 \pm 0,72 B	7,34 \pm 0,48 A	7,00 \pm 0,42 A
Labirinto placentário	6,77 \pm 1,61 A	6,79 \pm 0,33 A	6,77 \pm 1,78 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 9. Área de expressão imunoistoquímica de MIF em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	2,22 \pm 0,20 B	1,07 \pm 0,80 C	3,41 \pm 0,40 A
Labirinto placentário	0,70 \pm 0,37 A	0,49 \pm 0,27 A	0,51 \pm 0,40 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 10. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de MIF em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,64 \pm 0,30 B	1,70 \pm 1,27 C	5,48 \pm 0,62 A
Labirinto placentário	1,10 \pm 0,60 A	0,77 \pm 0,43 A	0,79 \pm 0,65 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 11. Área de expressão imunoistoquímica de iNOS em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	2,97 \pm 0,80 A	2,08 \pm 0,21 B	2,92 \pm 0,60 A
Labirinto placentário	3,56 \pm 0,74 B	1,72 \pm 0,51 C	4,33 \pm 0,38 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 12. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de iNOS em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	4,63 \pm 0,99 A	3,49 \pm 0,44 B	4,49 \pm 0,87 A
Labirinto placentário	5,24 \pm 0,96 B	2,65 \pm 0,85 C	6,21 \pm 0,37 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 13. Área de expressão imunoistoquímica de iNOS em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	2,33 \pm 0,71 A	1,92 \pm 0,39 A	1,97 \pm 0,42 A
Labirinto placentário	1,34 \pm 0,33 A	1,15 \pm 0,32 A	1,56 \pm 0,21 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 14. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de iNOS em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,78 \pm 1,12 A	3,14 \pm 0,62 A	3,34 \pm 0,60 A
Labirinto placentário	2,12 \pm 0,52 A	1,87 \pm 0,49 A	2,50 \pm 0,34 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 15. Expressão relativa de transcritos gênicos para TLR2 (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,08 \pm 0,41 A	1,31 \pm 0,47 A	1,22 \pm 0,36 A
14 dias	0,67 \pm 0,13 B	0,91 \pm 0,08 A	0,71 \pm 0,15 B
19 dias	0,26 \pm 0,03 A	0,26 \pm 0,06 A	0,26 \pm 0,06 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 16. Expressão relativa de transcritos gênicos para TLR4 (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,03 \pm 0,15 A	0,73 \pm 0,04 B	0,93 \pm 0,36 AB
14 dias	0,36 \pm 0,11 A	0,20 \pm 0,05 B	0,36 \pm 0,13 A
19 dias	0,07 \pm 0,01 A	0,05 \pm 0,01 B	0,07 \pm 0,01 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 17. Expressão relativa de transcritos gênicos para INF γ (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,02 \pm 0,23 A	0,57 \pm 0,22 B	1,27 \pm 0,42 A
14 dias	1,21 \pm 0,27 A	0,54 \pm 0,19 B	0,97 \pm 0,52 A
19 dias	0,53 \pm 0,08 B	0,72 \pm 0,25 B	1,94 \pm 0,24 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 18. Expressão relativa de transcritos gênicos para MIF (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,02 \pm 0,23 A	0,78 \pm 0,18 AB	0,59 \pm 0,19 B
14 dias	1,79 \pm 0,27 A	2,11 \pm 0,39 A	1,95 \pm 0,28 A
19 dias	0,17 \pm 0,03 B	0,19 \pm 0,03 B	0,26 \pm 0,03 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 19. Expressão relativa de transcritos gênicos para TNF α (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,01 \pm 0,12 A	0,74 \pm 0,29 B	0,64 \pm 0,24 AB
14 dias	0,32 \pm 0,09 A	0,37 \pm 0,12 A	0,42 \pm 0,15 A
19 dias	0,25 \pm 0,06 A	0,27 \pm 0,09 A	0,29 \pm 0,06 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 20. Expressão relativa de transcritos gênicos para IL-10 (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,19 \pm 0,70 B	0,92 \pm 0,38 B	2,54 \pm 0,54 A
14 dias	0,41 \pm 0,11 A	0,25 \pm 0,07 B	0,40 \pm 0,15 A
19 dias	0,21 \pm 0,04 B	0,28 \pm 0,09 B	0,62 \pm 0,18 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 21. Expressão relativa de transcritos gênicos para iNOS (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,11 \pm 0,54 A	1,09 \pm 0,31 A	0,94 \pm 0,43 A
14 dias	8,47 \pm 1,47 A	5,51 \pm 1,26 B	8,52 \pm 1,53 A
19 dias	2,04 \pm 0,14 A	2,40 \pm 0,60 A	2,32 \pm 0,29 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de T3 livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
0 dias de gestação	2,34±0,29 A	1,85±0,19 B	2,63±0,28 A
19 dias de gestação	1,76±0,28 A	1,18±0,15 B	1,98±0,55 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de T4 livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
0 dias de gestação	1,20±0,12 B	0,44±0,09 C	4,73±0,89 A
19 dias de gestação	0,79±0,17 B	0,10±0,08 C	2,46±0,64 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 3. Área de expressão imunoistoquímica de VEGF em pixels (x10⁵) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	2,79±0,78 B	3,58±0,65 A	1,37±0,65 C
Labirinto placentário	2,31±0,82 A	1,33±0,24 B	1,75±0,74 AB

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de VEGF em pixels (x10⁷) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	3,96±1,09 AB	4,68±0,72 A	1,81±0,80 C
Labirinto placentário	3,43±1,14 A	1,96±0,40 B	2,30±1,15 AB

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 5. Área de expressão imunoistoquímica de VEGF em pixels (x10⁵) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	4,04±1,91 A	1,75±0,47 B	2,30±1,48 B
Labirinto placentário	3,07±0,66 A	1,74±0,27 B	2,71±1,30 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 6. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de VEGF em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	5,61 \pm 2,31 A	2,64 \pm 0,70 B	3,27 \pm 1,88 B
Labirinto placentário	4,19 \pm 0,71 A	2,50 \pm 0,43 B	3,97 \pm 1,74 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 7. Área de expressão imunoistoquímica de Flk-1 em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	1,42 \pm 0,83 B	2,81 \pm 0,76 A	1,66 \pm 0,83 B
Labirinto placentário	3,37 \pm 1,42 A	3,77 \pm 0,94 A	3,83 \pm 1,48 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 8. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de Flk-1 em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	2,26 \pm 1,13 B	3,96 \pm 1,02 A	2,48 \pm 1,20 B
Labirinto placentário	4,48 \pm 1,58 A	4,91 \pm 0,97 A	5,15 \pm 1,73 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 9. Área de expressão imunoistoquímica de Flk-1 em pixels ($\times 10^5$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	1,26 \pm 0,68 A	1,96 \pm 0,84 A	1,95 \pm 0,65 A
Labirinto placentário	0,29 \pm 0,18 A	0,37 \pm 0,10 A	0,44 \pm 0,21 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 10. Densidade integrada da expressão imunoistoquímica de Flk-1 em pixels ($\times 10^7$) na placenta das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
Espongiotrofoblasto	1,92 \pm 1,02 A	2,93 \pm 1,16 A	3,00 \pm 0,99 A
Labirinto placentário	0,37 \pm 0,23 A	0,46 \pm 0,12 A	0,60 \pm 0,32 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 11. Expressão relativa de transcritos gênicos para VEGF (média \pm DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,03 \pm 0,27 B	1,17 \pm 0,31 B	1,77 \pm 0,41 A
14 dias	3,73 \pm 1,25 A	2,08 \pm 0,75 B	3,00 \pm 0,98 AB
19 dias	1,47 \pm 0,24 A	1,97 \pm 0,80 A	4,26 \pm 3,73 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 12. Expressão relativa de transcritos gênicos para Flk-1 (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,02±0,20A	0,50±0,19 C	0,76±0,20 B
14 dias	1,66±0,36 B	2,20±0,19 A	1,95±0,27 AB
19 dias	0,38±0,07 A	0,32±0,05 AB	0,29±0,05 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 13. Expressão relativa de transcritos gênicos para PGF (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	0,99±0,22 B	1,06±0,23 B	2,08±0,69 A
14 dias	0,86±0,37 A	0,46±0,11 B	1,00±0,34 A
19 dias	0,48±0,18 A	0,47±0,19 A	0,55±0,11 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 14. Expressão relativa de transcritos gênicos para sFlt-1 (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,12±0,56 A	1,19±0,52 A	0,93±0,32 A
14 dias	0,93±0,24 A	1,12±0,25 A	1,11±0,21 A
19 dias	0,66±0,07 A	0,67±0,18 A	0,44±0,14 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 15. Expressão relativa de transcritos gênicos para PL-1 (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,04±0,30 A	0,57±0,32 B	0,65±0,22 B
14 dias	0,12±0,02 B	0,11±0,05 B	0,19±0,03 A
19 dias	1,63±0,21 B	1,62±0,46 B	2,11±0,13 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 16. Expressão relativa de transcritos gênicos para rPlf (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,04±0,36 B	2,67±0,47 A	1,46±0,57 B
14 dias	7,14±4,13 A	3,69±1,05 B	7,13±2,53 A
19 dias	5,50±1,09 A	10,41±3,07 B	11,38±4,50 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de T4 livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
0 dias de gestação	1,20±0,12 B	0,44±0,09 C	4,73±0,89 A
19 dias de gestação	0,79±0,17 B	0,10±0,08 C	2,46±0,64 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 2. Index (média±DP) de migração endovascular das células trofoblásticas na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
14 dias	0,61±0,27 A	0,59±0,21 A	0,68±0,18 A
15 dias	0,69±0,11 A	0,64±0,23 A	0,67±0,13 A
16 dias	0,84±0,09 A	0,72±0,06 B	0,83±0,08 A
17 dias	0,88±0,12 A	0,66±0,09 B	0,82±0,07 A
18 dias	0,96±0,12 A	0,90±0,11 AB	0,83±0,13 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 3. Index (média±DP) de migração intersticial das células trofoblásticas na decídua das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina com 14, 15, 16, 17 e 18 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
14 dias	0,30±0,13 A	0,24±0,12 A	0,31±0,14 A
15 dias	0,65±0,10 A	0,43±0,26 B	0,54±0,11 AB
16 dias	0,81±0,11 A	0,81±0,14 A	0,82±0,11 A
17 dias	0,92±0,11 A	0,82±0,13 B	0,88±0,05 AB
18 dias	0,96±0,05 A	0,97±0,11 A	0,92±0,12 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4. Expressão relativa de transcritos gênicos para MMP2 (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,01±0,15 B	1,24±0,38 B	2,27±0,80 A
14 dias	1,41±0,57 A	0,58±0,25 B	1,85±0,77 A
19 dias	3,06±1,78 A	4,81±1,61 A	2,87±1,82 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 5. Expressão relativa de transcritos gênicos para MMP9 (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,05±0,33 A	0,75±0,14 A	1,07±0,68 A
14 dias	3,77±0,95 A	5,15±2,25 A	5,08±2,17 A
19 dias	1,13±0,25 A	0,86±0,17 B	1,13±0,41 AB

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 6. Expressão relativa de transcritos gênicos para leptina placentária (média±DP) na placenta das ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 10, 14 e 19 dias de gestação.

	Controle	Hipotireoideo	Tiroxina
10 dias	1,09±0,48 A	1,39±0,23 A	1,06±0,44 A
14 dias	0,52±0,18 A	0,33±0,08 B	0,41±0,08 AB
19 dias	0,50±0,08 A	0,54±0,08 A	0,57±0,16 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Expressão gênica (média±DP) de Tpbp nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10⁻⁴ M de T3, 10⁻⁷ M de T3 e 10⁻⁹ M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

	Controle	10⁻⁴ T3	10⁻⁷ T3	10⁻⁹ T3
24 horas	1,00±0,13 BC	1,88±0,97 B	5,25±2,12 A	5,88±0,88 A
48 horas	0,77±0,31 B	4,00±2,09 AB	7,93±5,72 A	7,08±3,71 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 2. Expressão gênica (média±DP) de Prl3b1 nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10⁻⁴ M de T3, 10⁻⁷ M de T3 e 10⁻⁹ M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

	Controle	10⁻⁴ T3	10⁻⁷ T3	10⁻⁹ T3
24 horas	2,72±3,02 B	2,20±1,41 B	10,80±3,24 A	4,34±1,40 B
48 horas	0,30±0,34 A	5,60±8,50 A	5,52±4,86 A	4,47±3,74 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 3. Expressão gênica (média±DP) de VEGF nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10⁻⁴ M de T3, 10⁻⁷ M de T3 e 10⁻⁹ M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

	Controle	10⁻⁴ T3	10⁻⁷ T3	10⁻⁹ T3
24 horas	1,18±0,73 B	0,63±0,32 B	6,02±3,88 A	1,52±0,51 B
48 horas	2,14±1,83 A	0,25±0,10 B	1,62±1,43 A	4,15±3,52 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 4. Tabela 1. Expressão gênica (média±DP) de PGF nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10⁻⁴ M de T3, 10⁻⁷ M de T3 e 10⁻⁹ M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

	Controle	10⁻⁴ T3	10⁻⁷ T3	10⁻⁹ T3
24 horas	1,02±0,23 B	1,36±0,49 B	2,09±0,58 A	2,31±0,71 A
48 horas	1,09±0,42 B	1,70±0,72 B	2,51±0,95 A	2,33±0,85 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 5. Expressão gênica (média±DP) de INFy nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10⁻⁴ M de T3, 10⁻⁷ M de T3 e 10⁻⁹ M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

	Controle	10⁻⁴ T3	10⁻⁷ T3	10⁻⁹ T3
24 horas	1,02±0,25 B	1,02±0,27 B	1,03±0,24 B	1,72±0,32 A
48 horas	0,55±0,23 B	0,66±0,09 B	1,37±0,53 A	1,02±0,13 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

Tabela 6. Expressão gênica (média±DP) de PL-1 nas células trofoblásticas dos grupos controle (sem T3), 10^{-4} M de T3, 10^{-7} M de T3 e 10^{-9} M de T3 com 24 e 48 horas de cultivo.

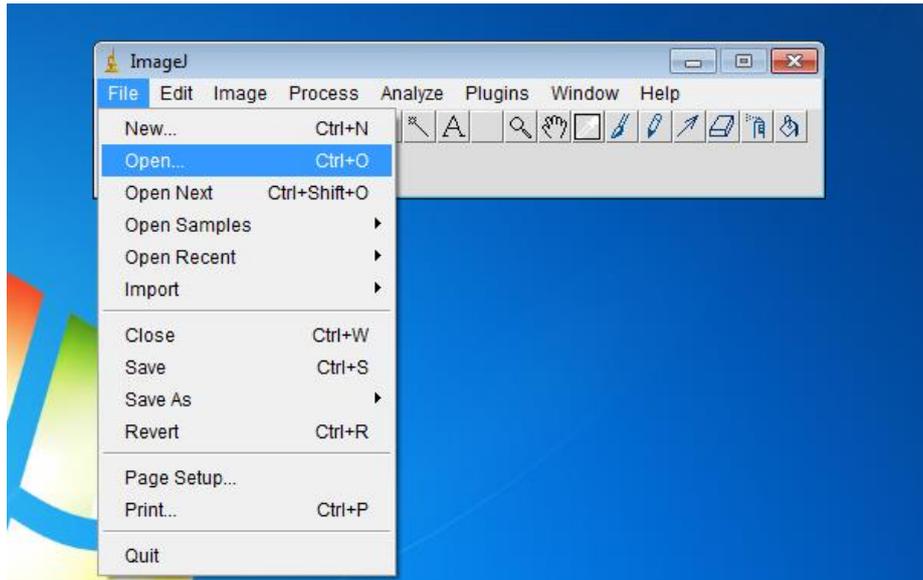
	Controle	10^{-4} T3	10^{-7} T3	10^{-9} T3
24 horas	1,03±0,26 B	0,49±0,27 C	1,61±0,27 A	1,60±0,24 A
48 horas	1,02±1,94 B	0,41±0,29 B	4,22±2,37A	1,01±0,44 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

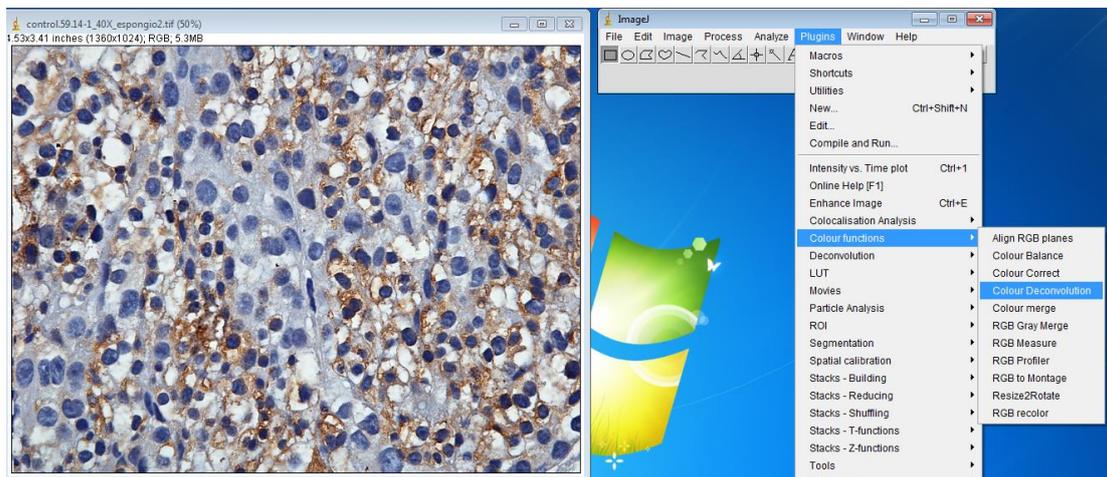
ANEXO 3

PROTOCOLO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA IMUNOISTOQUÍMICA PELO PROGRAMA WCIF ImageJ

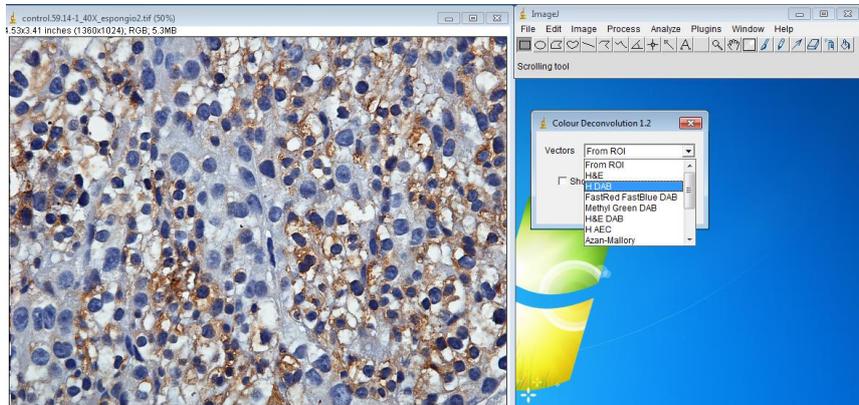
1. Abrir o programa WCIF ImageJ
2. *File*
3. *Open* (escolha uma imagem do grupo controle para padronizar a leitura)



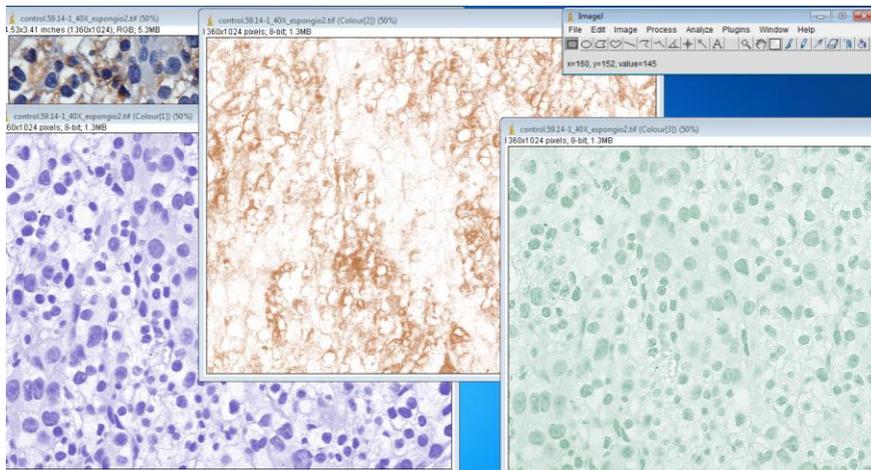
4. *Plugins* → *Colour functions* → *Colour Deconvolution*



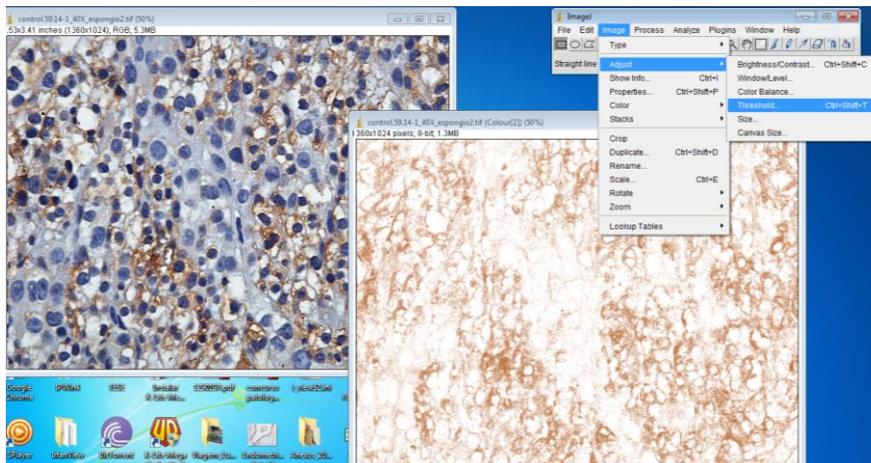
5. Escolher “DAB H”



6. A imagem será dividida em três planos: *Colour 1*, *Colour 2* (da marcação pelo DAB) e *Colour 3*. Feche as janelas da *Colour 1* e 3.

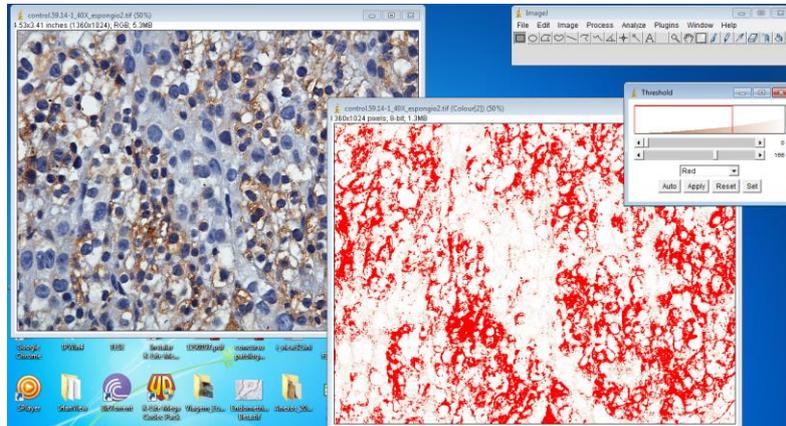


7. *Image* → *Adjust* → *Threshold*



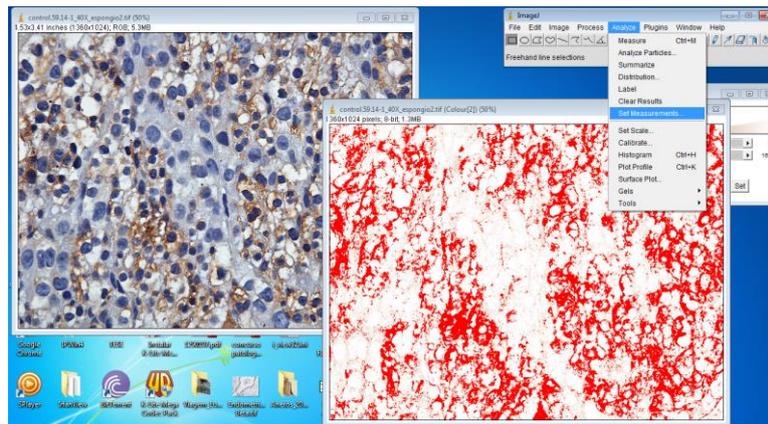
8. Coloque 0 na primeira barra e escolha um valor na segunda barra que represente a marcação na sua imagem de imunohistoquímica (vermelho). Este valor deverá ser o mesmo em todas as outras imagens dos outros grupos experimentais.

Obs.: Para cada período experimental e para cada anticorpo deve-se realizar a padronização deste valor antes de proceder a análise.

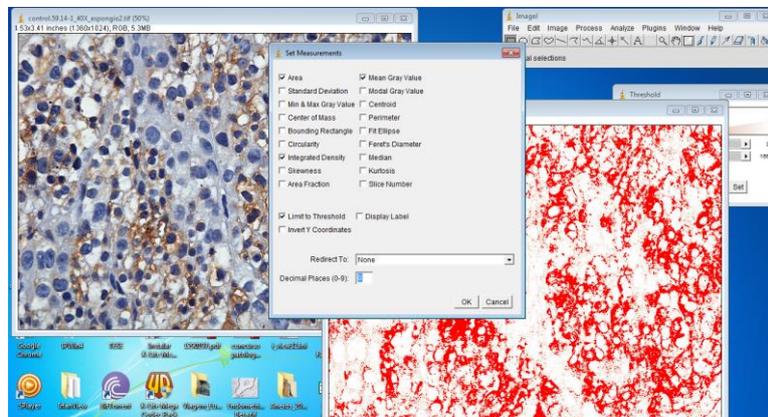


9. Apply → Cancel

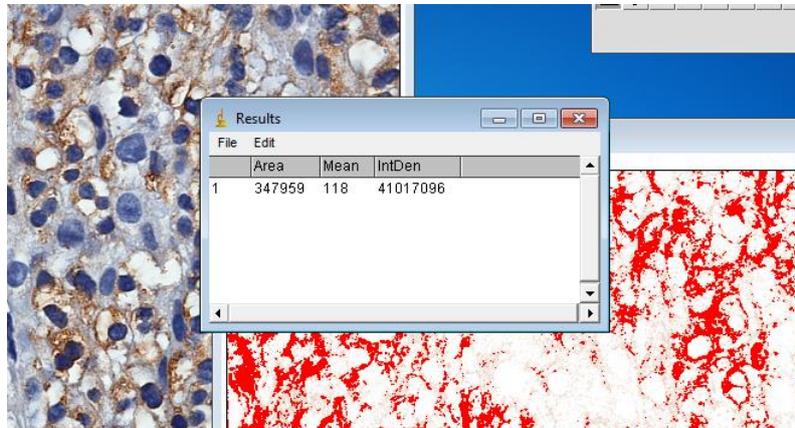
10. Analyze → Set Measurements



11. Escolha a variáveis que serão avaliadas: “Area” e “Integrated Density”



12. Ctrl + M



13. O resultado pode ser salvo e/ou copiado para o programa Excel.

14. Escolha a próxima imagem e repita a análise.

ANEXO 4

PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA

Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase

- Xilol 1 (30 min)
- Xilol 2 (30 min)
- Álcool absoluto 1 (5 min)
- Álcool absoluto 2 (5 min)
- Álcool absoluto 3 (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)
- Banho Maria a 98°C (Tampão Citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Bloqueio da peroxidase (30 min) (no escuro – 6 ml de H₂O₂ e completar para 200 ml de metanol –

FAZER NA HORA)

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Soro bloqueio (30 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- Anticorpo 1° (overnight) – (câmara úmida na geladeira)

Obs: A diluição do arquivo está presente no material e métodos.

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Anticorpo 2° (45 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Estreptovidina-peroxidase (30 min)- (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- DAB (1 gota em 1 ml de diluente)

Obs.: O tempo do DAB variou de acordo com o anticorpo primário.

- Água corrente (10 min)
- Hematoxilina (60 seg)
- Água corrente (10 min)
- Álcool 70% (3 min)
- Álcool 80% (3 min)
- Álcool 90% (3 min)
- Álcool absoluto 3 (10 min)
- Álcool absoluto 2 (10 min)
- Álcool absoluto 1 (10 min)
- Xilol 2 (10 min)
- Xilol 1 (10 min)
- Montagem da lâmina

Preparo dos reagentes:

TAMPÃO CITRATO: 1,05g de ácido cítrico + 500ml de dH₂O (ajustar o pH para 6,0)

PBS: 7,2g de NaCl + 0,43g de fosfato de sódio monobásico + 1,48g de fosfato de sódio dibásico + 1 L de dH₂O

ANEXO 5

EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL COM TRIZOL (TECIDO):

1. Homogeneizar o fragmento de tecido dentro de um eppendorfe de 1,5 ml com 500 µL de Trizol com o uso de um homogeneizador.
 2. Adicionar mais 500 µL de Trizol no eppendorfe e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
 3. Adicionar 200 µL de clorofórmio/eppendorfe, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos no gelo.
 4. Centrifugar por 15 minutos a 12000g (4°C).
 5. Transferir a fase aquosa para outro eppendorfe.
 6. Adicionar 500 µL de isopropanol e incubar por 30 minutos a -80°C .
 7. Descongelar no gelo e centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C).
 8. Retirar o sobrenadante e colocar em outro eppendorfe. Acondicionar o pellet no gelo e centrifugar o sobrenadante por 10 min a 12000g (4°C).
 9. Descartar o sobrenadante e lavar os pellets com 1 ml de etanol 75%.
 10. Centrifugar por 5 minutos a 10500g (4°C).
 11. Secar o pellet por 5 minutos.
 12. Dissolver o pellet em água DEPC (20 µl).
 13. Colocar todos os tubos no termobloco a 56°C durante 10 minutos (para solubilizar o RNA)
 14. Dosar o RNA em espectrofotômetro ou Nanovit. Caso for realizar a dosagem no espectrofotômetro, fazer uma diluição do RNA de 1:50.
- Obs.: Estocar o RNA a -80°C.

Diluição para dosar:

Utilizar o eppendorfe de 600 µL.

Colocar 98 µl de água DEPC + 2 µl do RNA

Leitura no espectrofotômetro:

Liga o aparelho no botão atrás do mesmo (espera 30 minutos para iniciar)

RNA

DILUIÇÃO

BLANK→ 100µl água DEPC

SAMPLE→ 100µl do RNA diluído 1:49 = 2:98

ANEXO 6

SÍNTESE DO cDNA:

1. Kit utilizado: Kit Super Script III Platinum two step qRT-PCR with SYBR Green (cat. n. 11735-032).

Obs. 1: Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em espectrofotômetro e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.

Obs. 2: Concentração de RNA - 1µg de RNA total.

Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 400 µg/1000 µL

400 µg _____ 1000 µL

1 µg _____ x

x = 2,5 µL de RNA

Assim colocar 2,5 µL de RNA + 5,5 µL de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µL.

3. Preparar o Master MIX :

Master MIX	1x	Ex.: 5x
2x RT reaction MIX	10 µL	50 µL
RT enzyme MIX	2 µL	10 µL
RNA (1µg)	2 µL	-----
Água DEPC qsp 20 µl	6 µL	-----

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 12 µL de MIX em cada tubo e acrescentar 8 µL de RNA + água DEPEC (um por amostra).

4. Fazer um *spin* nos tubos e colocá-los no Termociclador programado da seguinte forma:

- *programação A:*

25°C por 10 minutos

42°C por 50 minutos

85°C por 5 minutos

Hold – 4°C

5. Colocar no gelo as amostras e adicionar 1 µL de RNase H por tubo. Colocá-los no Termociclador novamente programado da seguinte forma:

- *programação B:*

37°C por 20 minutos

Hold – 4°C

6. Estocar o cDNA a -20°C

. ANEXO 7

RT-PCR TEMPO REAL:

1. Kit utilizado: *Kit Super Script III Platinum two step qRT-PCR with SYBR Green* (cat. n. 11735-032).
2. Aparelho utilizado: *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*
3. Recomendação do kit: volume final de reação de 50 μL , porém faz-se 25 μL de volume final, ou seja, 2,5 μL de cDNA para 25 μL de reação.

4. Preparar o Mix:

MIX	1x	Ex.: 6x
<i>SYBR Green</i>	12,5 μL	75 μL
<i>Primer forward</i>	1 μL	6 μL
<i>Primer reverse</i>	1 μL	6 μL
<i>Rox</i>	1 μL	6 μL
cDNA	2,5 μL	-----
Água DEPC	7,0 μL	42 μL

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 22,5 μL de MIX em cada poço e acrescentar 2,5 μL de cDNA (um por amostra) ou 2,5 μL de água DEPC (controle negativo).

Diluição do Rox: 1 μL do Rox concentrado para 9 μL de água DEPC

Preparar um MIX para cada *primer*, sendo que se coloca primeiro a água DEPC, segundo o *SYBR Green*, terceiro o *Rox* e depois os *primers forward* e *reverse*.

5. Após preparar a placa de PCR contendo MIX + cDNA é importante dar um *spin* na placa antes de colocá-la na máquina de PCR tempo real.

6. Programação da máquina de RT-PCR (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*):

	Estágio	Repetições	Temperatura	Tempo
Ativação da enzima (hold)	1	1	95°C	10 min
PCR (ciclos)	2	40	95°C 60°C	15 sec 1 min

ANEXO 8

REACÇÃO RT-PCR TEMPO REAL (CÉLULA) Kit utilizado: Power SYBR® Green Cells-to-Ct™

LISE CELULAR

Obs.: Mantenha todos os reagentes acondicionados no gelo durante o procedimento.

- 1- Aspire e descarte o meio de cultura.
- 2- Lave 1X as células com PBS a 4°C na placa de cultura e remova o máximo de PBS possível.
- 3- Adicione 50µL de solução de lise (com DNase 1 na proporção de 1:100) em cada poço.
- 4- Misture a solução de lise com as células 5X com o uso de uma pipeta. Cuidado para não formar bolha.
- 5- Incube a reação de lise por 5 min a temperatura ambiente.
- 6- Adicione 5µL de solução stop em cada poço e misture 5X. Cuidado para não formar bolha.
- 7- Incube a reação por 2 min a temperatura ambiente.

Obs.: O lisado pode ser estocado no gelo por no máximo 2 horas ou a -20°C ou -80°C por no máximo 5 meses.

SÍNTESE DO cDNA

1. Preparar o Master MIX:

Master MIX	1x	Ex.: 5x
2x SYBR® RT Buffer	25 µL	125 µL
20X RT Enzyme Mix	2,5 µL	12,5 µL
Água DEPC	12,5 µL	62,5 µL
Lisado	10 µL	-----

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 40 µL de MIX em cada tudo e acrescentar 10 µL do lisado (um por amostra). Volume final de 50µL.

As reações podem ser estocadas a 4°C por até 4 horas.

2. Fazer um *spin* nos tubos e colocá-los no Termociclador programado da seguinte forma:

- *programação A:*

37°C por 60 minutos

95°C por 5 minutos

Hold – 4°C

3. Estocar o cDNA a -20°C

RT-PCR TEMPO REAL

1. Aparelho utilizado: *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*

2. Recomendação do kit: volume final de reação de 20 µL ou 50 µL.

3. Preparar o Mix:

MIX	1x (Volume final: 20 µL)	Ex.: 6x
Power SYBR® Green PCR Master Mix	10 µL	60 µL
<i>Primer forward</i>	1 µL	6 µL
<i>Primer reverse</i>	1 µL	6 µL
Água DEPC	4 µL	12 µL
cDNA	4 µL	-

Obs.1: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 16 µL de MIX em cada poço e acrescentar 4 µl de cDNA (um por amostra) ou 4 µl de água DEPC (controle negativo).

4. Após preparar placa de PCR contendo MIX + cDNA é importante dar um *spin* na placa antes de colocá-la na máquina de PCR tempo real.

5. Programação da máquina de RT-PCR (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*):

	Estágio	Repetições	Temperatura	Tempo
Ativação da enzima (hold)	1	1	95°C	10 min
PCR (ciclos)	2	40	95°C 60°C	15 sec 1 min

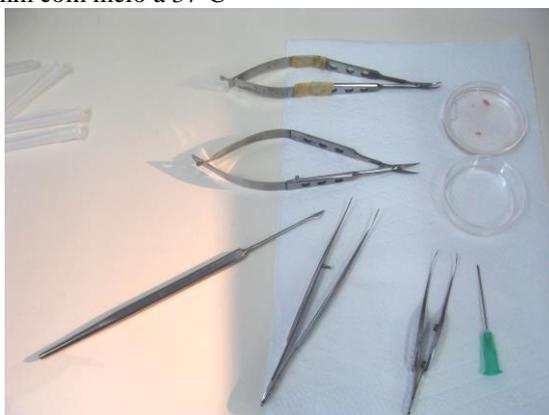
ANEXO 9

COLETA DO CONE ECTOPLACENTÁRIO

A coleta de cone ectoplacentário do camundongo é realizada com 7,5 dias de gestação. Na rata é aos 8,5 dias de gestação.

Para realizar a coleta deve-se preparar:

- Meio: PBS + SFB 10% + Anfotericina + Gentamicina + AB (estreptomicina + penicilina)
- Dois conjuntos de tesoura e pinça
- Pinça e tesoura de uso oftalmológico para dissecar o cone ectoplacentário
- Alça de uso microbiológico para retirar os embriões do corno uterino
- Agulha
- Placas de 33 e 60mm com meio a 37°C

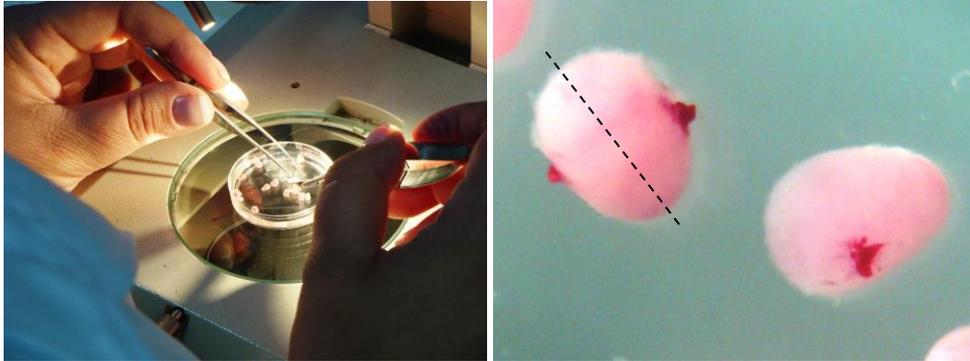


PROCEDIMENTO:

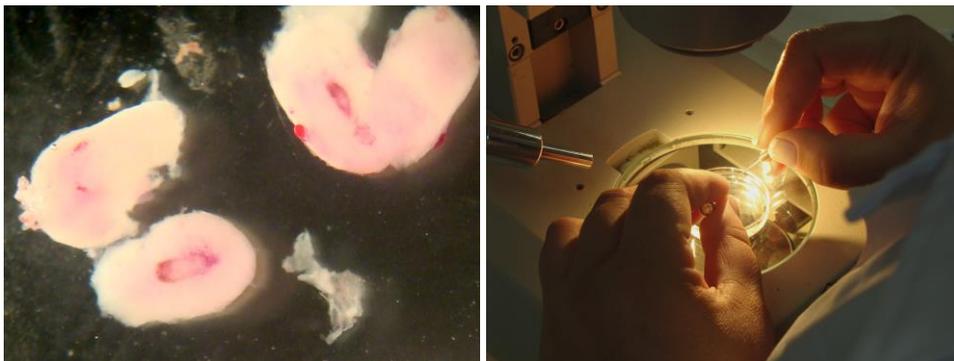
- 1- Eutanásia do animal (deslocamento cervical).
- 2- Abre a cavidade peritoneal.
- 3- Desloca lateralmente os intestinos.
- 4- Expõe os cornos uterinos (com outra pinça e tesoura).
- 5- Retira todo o útero cortando após a cérvix e depois dos ovários (pedículo ovariano) e coloca dentro de uma placa de 60mm com meio. Faz a limpeza do útero no meio retirando o excesso de sangue e de tecido adiposo.
- 6- Com uma tesoura fina abre o útero expondo os sítios placentários. Cuidado para não abrir a membrana córioalantóideia.
- 7- Com o uso de um alça microbiológica retira os sítios de implantação de forma delicada.
- 8- Coloca os sítios de implantação na placa de 60mm com meio.



- 9- Com o uso de um estereomicroscópio realiza a dissecação dos cones ectoplacentários.
9.1- Será visualizado todo o sitio de implantação de cada embrião.



- 9.2- Estabiliza o sitio com uma pinça e corta no meio dele entre duas dilatações que se encontra em um dos pólos (corta o sitio entre as duas redes vasculares evidenciadas em vermelho).
9.3- Será observado todo o embrião ligado ao cone ectoplacentário e às membranas extraembrionárias.
9.4- Destaca o embrião com o uso de uma agulha.



- 9.5- Após destacar vai ficar de um lado o embrião (se retirá-lo inteiro)/ou o cone ectoplacentário com anexos e do outro lado a decídua (mesometrial e antimesometrial).



9.6- Disseca todo o embrião com o uso de duas agulhas até que sobre apenas o cone ectoplacentário. Cuidado para não encostar no cone ectoplacentário.



9.7- Após dissecar, coloque o cone em uma placa de 33mm com meio com o uso de uma pipeta e mantenha a 37°C até que finalize os outros sítios.

9.8- Leve os cones para o cultivo.

ANEXO 10

CULTIVO DO CONE ECTOPLACENTÁRIO

1. Passe os cones coletados para outra placa de 60mm com meio suplementado*. Vá realizando a troca de uma placa pra outra com meio suplementado até que não haja mudança da cor do meio (mais claro) ao redor dos cones. Faça isso com o uso de uma pipeta.
2. Coloque as placas ou poços com lamínulas contendo os cones na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Realize a troca do meio a cada 2 dias ou antes caso o meio fique mais alaranjado.
3. Em 24 hs os cones já vão começar a aderir na placa e as células trofoblásticas vão começar a se diferenciar e espalhar na placa. Poderá ser observado células gigantes trofoblásticas já com 24 ou 48 hs de cultivo (Figura 1).

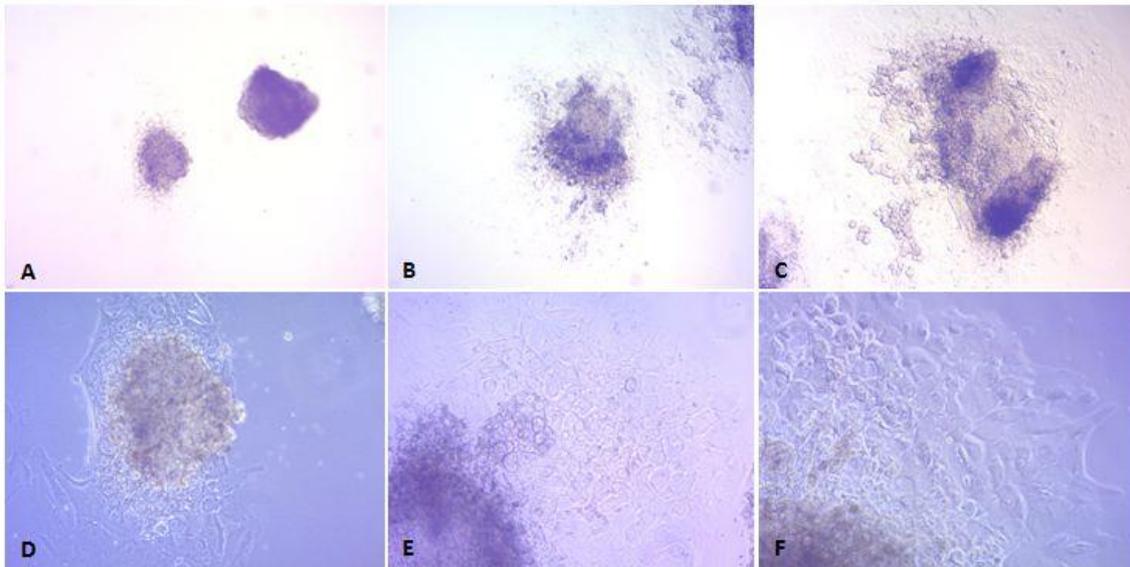


Figura 1. Cultivo de cone ectoplacentário. A) 24 horas de cultivo. B) 48 horas de cultivo. C-F) 72 horas de cultivo.

***PREPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES:**

- Mitos: já compra pronto pra uso
- BSA: preparado na concentração de 30%
- Estreptomicina: 100mg/ml
- Penicilina: 100.000 UI/ml
- Gentamicina: 50 mg/ml
- Insulina: 50µl/ml de H₂O Milli-Q estéril
- Anfotericina: 25 UI/ml
- Heparina: 5.000 UI/ml
- Dexametasona: 20µg/ml
- Vitamina C: pronto pra uso

MEIO PARA CULTIVO DE CONE ECTOPLACENTÁRIO:

Para 10 ml de meio:

- pH: 7,8 – 8,0
- DMEM
- Piruvato de sódio – 200 µl
- Lactato de cálcio - 200 µl
- Insulina: 10 µl
- Mito: 10 µl
- BSA: 100 µl
- AB: 10 µl
- Gentamicina: 10 µl
- Anfotericina: 25 µl
- SFB: 2 ml (20%)