

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Saffir Dominique Fernandes

Avaliação de parâmetros reprodutivos e caracterização morfológica da placenta de camundongos gestantes deficientes do ‘fator de troca de nucleotídeos guanina para a proteínas ras’ RasGEF1b

Belo Horizonte
2022

Saffir Dominique Fernandes

Avaliação de parâmetros reprodutivos e caracterização morfológica da placenta de camundongos gestantes deficientes do ‘fator de troca de nucleotídeos guanina para a proteínas ras’ RasGEF1b

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Dr. Aristóbolo Mendes da Silva

Belo Horizonte
2022

043

Fernandes, Saffir Dominique.

Avaliação de parâmetros reprodutivos e caracterização morfológica da placenta de camundongos gestantes deficientes do 'fator de troca de nucleotídeos guanina para a proteínas Ras' RasGEF1b [manuscrito] / Saffir Dominique Fernandes. – 2022.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida.

Coorientador: Dr. Aristóbolo Mendes da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Fatores ras de Troca de Nucleotídeo Guanina. 3. Fertilidade. 4. Placenta. I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Silva, Aristóbolo Mendes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Instituto de Ciências Biológicas
 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SAFFIR DOMINIQUE FERNANDES

Às nove horas do dia 16 de dezembro de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA PLACENTA DE CAMUNDONGOS GESTANTES DEFICIENTES DO 'FATOR DE TROCA DE NUCLEOTÍDEOS GUANINA PARA A PROTEÍNA RAS' - RASGEF1B**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Fernanda Radicchi Campos L. Almeida	UFMG	Aprovado
Dr. Aristóbolos Mendes da Silva	UFMG	Aprovado
Dra. Adriana Abalen Martins Dias	UFMG	Aprovado
Dr. Enrico Bloise	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2022.**

Dr^a. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Orientadora)

Dr. Aristóbolos Mendes da Silva (Coorientador)

Dr. Adriana Abalen Martins Dias

Dr. Enrico Bloise

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por Aristobolo Mendes da Silva, Professor do Magistério Superior, em 16/12/2022, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Enrico Bloise, Professor do Magistério Superior, em 16/12/2022, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior, em 16/12/2022, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Adriana Abalen Martins Dias, Professora do Magistério Superior, em 16/12/2022, às 19:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1969969 e o código CRC 38C4E3AC.

À minha família, que sempre me sustentou

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pela oportunidade e pelo sustento em todo esse processo e pela fidelidade maior que a minha. Soli Deo Gloria.

Gostaria de agradecer à minha família, meu pai, minha mãe e meu irmão, por sempre me apoiarem e incentivarem, e às vezes mostrar mais entusiasmo com minhas conquistas que eu. Agradeço também por ter um cachorro que é um bom companheiro e uma constante desculpa para passear e assim arejar a cabeça.

Agradeço imensamente a minha professora Fernanda Radicchi C. L. de Almeida, que tem me orientado por todos esses cinco anos desde a Iniciação Científica, me proporcionando tantas oportunidades que nunca achei ser capaz de experimentar, e por me guiar e coordenar com tanta competência, sabedoria, humildade e doçura impressionantes.

Agradeço também ao professor Aristóbolo, que aceitou ser meu coorientador e me apresentou a um universo tão fascinante dos estudos moleculares, e sempre me esclareceu dúvidas com paciência e entusiasmo, além de fornecer seus animais e oferecer seu campo de estudo para que realizássemos esse trabalho.

Estendo esse agradecimento também a todos aqueles que me orientaram e me auxiliaram ao longo da minha caminhada na pesquisa acadêmica, principalmente no LABER, em especial o professo Hélio Chiarini-Garcia e a doutora Thaís Garcia Santos, que me pegou no colo quando ainda era um IC recém-chegado ao mundo da pesquisa.

Agradeço ao Lucas, que apesar de ser meu calouro está anos-luz a minha frente em conhecimento, habilidade e profissionalismo, e que por incontáveis vezes se mostrou um colega confiável e um amigo querido. Espero poder comemorar com ele as muitas conquistas que ainda lhe virão.

Agradeço também a todos os meus colegas do LABER, que além de aprendizado e ajuda, também oferecem um ambiente cordial e muito frutífero para a vida profissional e pessoal; agradeço em especial ao João, o Túlio e o Jonathas, por terem se tornando não apenas excelentes colegas, mas também queridos amigos, que me fazem sentir tão acolhido.

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Genes Inflamatórios, Sérgio, Cícera, Michaelle e Giovani, por terem me acolhido no laboratório e me integrado sempre que possível às atividades do grupo dentro e fora da UFMG.

Agradeço aos meus amigos e familiares que sempre acompanharam minha jornada com orgulho e incentivo, e que mesmo em períodos de pouco contato foram gentis em lembrar de mim. Agradeço em especial ao Mateus, por ter sido meu grande amigo desde a graduação e continuar sendo um parceiro dentro e fora do ICB, seja saindo para comer e conversar, seja me ajudando no projeto oferecendo de sua lupa para eu tirar fotos de placenta que ele acha nojento (dito isso, obrigado ao Laboratório de sistemática Vegetal pela disponibilização de seus aparelhos!).

Agradeço a coordenação do programa de pós-graduação em biologia celular e à ACC, pela oportunidade de integrar o corpo discente do programa, por me orientar tão bem e pela compreensão com os prazos e demandas. Agradeço também a todos que direta ou indiretamente tornam possível trabalhar no ICB e desenvolver nossas pesquisas, seu trabalho merecer ser muito valorizado e reconhecido. Agradeço também ao CAPI, por abrir suas portas oferecendo treinamento e aparelhos essenciais para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a banca, por aceitar fazer parte desse processo, ler esse trabalho e oferecer suas contribuições, que certamente serão muito construtivas e bem-vindas.

Agradeço às instituições de fomento, CAPES, CNPq e Fapemig, pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro concedido para a realização desse mestrado.

Finalmente, agradeço aos animais, cujas vidas tiramos para tentar ajudar outras. Que suas mortes sejam sempre respeitadas e transformadas em conhecimento e melhora de vida para todos.

RESUMO

A técnica para obtenção de animais nocautes revolucionou o campo da genética, permitindo o estudo da função de um gene por meio da comparação entre um animal selvagem e outro com o gene deletado. Diversas funções gênicas foram descobertas com essa técnica, mas muitos genes e suas funções em diferentes tecidos ainda precisam ser elucidados, dentre eles o Rasgef1b. Tal gene codifica para um fator de troca de nucleotídeos guanina de GTPases do tipo Ras, que controlam a ativação de vias de sinalização importantes na regulação de diversos processos metabólicos como proliferação e sobrevivência celular. Embora a expressão de RasGEF1b ocorra predominantemente em macrófagos, a mesma pode ser detectada, mesmo que em menores níveis, em outros tecidos, como a placenta. A placenta é um órgão crucial no desenvolvimento pré-natal de mamíferos, por ser responsável pela interface materno-fetal, região de troca de nutrientes e gases respiratórios. Ademais, é extremamente sensível a distúrbios, e há evidências de que diferentes genes desempenham funções críticas sobre sua morfofuncionalidade. Portanto, estudar a placenta e os parâmetros reprodutivos de fêmeas desprovidas do fator RasGEF1b é uma maneira promissora e inédita de investigar o papel desse gene sobre a capacidade reprodutiva. Para isso, camundongos fêmeas dos tipos selvagem e RasGEF1b-cKO foram avaliadas quanto a parâmetros reprodutivos antes e durante a gestação, momento em que suas placentas foram coletadas (dia gestacional 17.5), para análises histomorfométricas. Fêmeas RasGEF1b-cKO apresentaram ciclo estral e taxa de prenhez semelhantes a fêmeas WT ($P > 0,05$). Adicionalmente, apresentaram menor número de fetos e reabsorções ($P < 0,05$). Os fetos provenientes das fêmeas nocaute apresentaram biometria semelhante a fetos WT, porém as placentas de animais nocaute apresentaram diferenças biométricas e histológicas como maior peso, menor diâmetro e eficiência, além de maior proporção de vasos fetais no labirinto e de vasos maternos na zona juncional, membrana interheme mais espessa e vasos fetais maiores ($P < 0,05$). Nossos dados demonstram de maneira inédita as alterações reprodutivas e placentárias oriundas da deficiência do fator RasGEF1b em fêmeas murinas.

PALAVRAS-CHAVE: camundongos nocaute; rasgef1b; fertilidade; placenta; caracterização morfológica.

ABSTRACT

The technique to obtain knockout animals revolutionized the field of genetics, allowing the study of the function of a gene through the comparison between a wild animal and another with the deleted gene. Several gene functions have been discovered with this technique, but many genes and their functions in different tissues still need to be elucidated, among them *Rasgef1b*. This gene encodes for a guanine nucleotide exchange factor of Ras-like GTPases, which control the activation of signaling pathways important in the regulation of various metabolic processes such as cell proliferation and survival. Although *RasGEF1b* expression occurs predominantly in macrophages, it can be detected, even at lower levels, in other tissues such as the placenta. The placenta is a crucial organ in the prenatal development of mammals, since it is responsible for the maternal-fetal interface, a region of exchange of nutrients and respiratory gases. Moreover, it is extremely sensitive to disturbances, and there is evidence that different genes play critical roles on its morphofunctionality. Therefore, studying the placenta and reproductive parameters of females lacking the *RasGEF1b* factor is a promising and novel way to investigate the role of this gene on reproductive capacity. To this end, wild-type and *RasGEF1b*-KO female mice were evaluated for reproductive parameters before and during gestation, at which time their placentas were collected (gestational day 17.5) for histomorphometrical analyses. *RasGEF1b*-KO females had similar estrous cycle and pregnancy rate to WT females ($P > 0.05$). Additionally, they showed fewer fetuses and resorptions ($P < 0.05$). Fetuses from knockout females showed similar biometrics to fetuses from WT females. However, placentas from knockout animals showed biometric and histological differences, such as higher weight, smaller diameter and efficiency, and a higher proportion of fetal vessels in the labyrinth and maternal vessels in the junctional zone, thicker interheme membrane, and larger fetal vessels ($P < 0.05$). Our data demonstrate, in an unprecedented manner, the reproductive and placental alterations arising from *RasGEF1b* factor deficiency in murine females.

KEY WORDS: knockout mice; *rasgef1b*; fertility; placenta; morphological characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Interação entre RasGEFs e RasGTPases, demonstrando a conversão entre as formas inativas e ativas da superfamília Ras.....	19
Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de afinidades entre RasGEF e RasGTPases.....	20
Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de transcrição do Rasgef1b.....	21
Figura 4: Representação esquemática do cruzamento entre um indivíduo Cre e um indivíduo homozigoto, contendo o gene-alvo flanqueado por LoxP, para obtenção de animal nocaute...	24
Figura 5: Representação esquemática das camadas placentárias (Felicioni, 2019).....	29
Figura 6: Design experimental do projeto.....	38
Figura 7: Lavado vaginal de fêmeas murinas (Croy et al., 2014).....	39
Figura 8: Análises histomorfométricas placentárias.....	43
Figura 9: Proporção das fases do ciclo estral de fêmeas WT e KO.....	44
Figura 10: Lavados vaginais e plugue vaginal.....	46
Figura 11: Fotomicrografias de placentas WT e KO.....	50
Figura 12: Fotomicrografias de labirintotrofoblasto e zona juncional.....	52
Figura 13: Esquema com os resultados encontrados.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros reprodutivos de fêmeas WT e KO.....	47
Tabela 2: Biometria de fetos proveniente de fêmeas WT e KO.....	48
Tabela 3: Biometria de placentas de fêmeas WT e KO.....	49
Tabela 4: Área das camadas placentárias de fêmeas WT e KO.....	51
Tabela 5: Proporção volumétrica de Labirintotrofoblasto e Zona Juncional de fêmeas WT e KO.....	51
Tabela 6: Espessura interheme e área de vasos fetais de fêmeas WT e KO.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

4q21	Cromossomo quatro, banda q, região 21
Arf	Fator de ribosilação de adenina
CTE	Células-tronco embrionárias
CTG	Células trofoblásticas gigantes
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
GDP	Guanina di-fosfato
GEF	Guanine exchange factors, fatores de troca de guanina
GTP	Guanina tri-fosfato
KO	Knockout, ou nocaute
MEK	Quinase ativadora de MAPK
NFκB	Nuclear factor for κ chains of B cells
Ras	Rat Sarcoma
Sos	Son of sevenless
Synt	Sincitina
TLR	Toll-like receptor
uNK	Uterine natural killers
WT	Wild-type, ou selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. RasGEF e RasGTPases.....	18
2.1.1. O gene Rasgef1b.....	20
2.1.2. A recombinase Cre e o sistema Cre-LoxP.....	23
2.2. Fertilidade feminina e placenta.....	25
2.2.1. Aspectos gerais.....	25
2.2.2. O ciclo reprodutivo das fêmeas.....	26
2.2.3. A placenta.....	27
2.2.3.1. Formação e morfologia placentária.....	27
2.2.3.2. Imunidade placentária e macrófagos.....	30
2.2.3.3. Importância biológica e crescimento fetal.....	30
2.2.3.4. RasGEF e vias ativadas por Ras no contexto reprodutivo e no desenvolvimento placentário.....	32
2.2.3.5. Animais nocaute e placenta.....	33
3. HIPÓTESE.....	36
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo geral.....	36
4.2. Objetivos específicos.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1. Comitê de ética.....	37
5.2. Animais e design experimental.....	37
5.3. Acompanhamento do ciclo estral e tentativas de acasalamento.....	38
5.4. Procedimentos de eutanásias.....	40
5.5. Coleta de material biológico.....	40
5.6. Processamento do material.....	41
5.7. Análises histomorfométricas placentárias.....	41
5.8. Análises estatísticas.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1. Observação dos ciclos estrais.....	44
6.2. Parâmetros reprodutivos.....	46
6.3. Biometrias de fetos e placentas.....	48
6.4. Análises histomorfométricas placentárias.....	50
6.5. Perspectivas.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	57
9. ANEXO I.....	69

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Animais nocaute são uma das classes de animais transgênicos, desenvolvidos para estudos moleculares. Nessa classe, um gene é deletado da sequência de DNA por meio de ferramentas moleculares, dentre elas, o sistema Cre/LoxP, no qual o gene-alvo é flanqueado por sequências LoxP. Animais adultos que abrigam o gene flanqueado são posteriormente cruzados com um animal que expressa a recombinase Cre de maneira tecido-específica ou ubíqua (Kim et al., 2018). A prole desse cruzamento expressará a recombinase Cre, possuindo o gene-alvo flanqueado, que é então eliminado do genoma, sendo assim nocaute para esse gene (McLellan et al., 2017).

A tecnologia de animais nocaute é a principal ferramenta utilizada para estudos genéticos, especialmente para determinação da função de um gene, dada a possibilidade de investigar os efeitos morfofuncionais da deleção de um gene específico que essa técnica permite (Navapbour et al., 2020). Diversos genes já tiveram sua função elucidada, porém vários outros se encontram parcial ou completamente incompreendidos.

Essa questão pode ter como complicador o fato de alguns tecidos não serem estudados por não apresentarem alterações óbvias ou aberrantes, ou por não estarem identificados como alvos clássicos da ação da proteína codificada ou tecidos onde a expressão do gene seja predominante ou até mesmo moderada (Rossant & Cross, 2001; Perez-Garcia et al., 2018). Nesse contexto, em animais nocaute, cujos genes não estão diretamente associados à função reprodutiva, o sistema reprodutivo normalmente não se torna alvo de investigações científicas.

O Rasgef1b é um gene que codifica para uma molécula da família dos fatores de troca de nucleotídeos guanina associados a Ras (GEFs, do inglês guanine-nucleotide exchange factors), que atuam ativando Ras GTPases (como Rap2) (Yaman et al., 2009; Andrade et al., 2010; Carvalho et al., 2019). Estas, por sua vez, são proteínas envolvidas na ativação de vias de sinalização de proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, entre outros, como organização do citoesqueleto de actina, tráfego de vesículas e expressão gênica (Mitin et al., 2005; Rojas & Santos, 2006; Vigil et al., 2010). Entretanto, a função específica da proteína codificada por Rasgef1b ainda não é conhecida. Esse gene é expresso principalmente em macrófagos, mas também é encontrado no sistema nervoso e na placenta de camundongos e humanos (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=320292>, acessado em 21/11/2022;

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3142:1454742_at,
acessado em 21/11/2022;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3113:131473>, acessado em
21/11/2022).

A placenta é um órgão vital para o desenvolvimento intrauterino de mamíferos, pois estabelece uma interface entre o feto e a mãe, sendo o local de trocas gasosas, de nutrientes e substrato energéticos, além de receber as excreções do feto (Alvino, 2009; Vanderley & Santana, 2015). Por ser tão crucial para o desenvolvimento, é um órgão extremamente sensível a distúrbios e à má formação; em animais nocaute, por exemplo, quase 70% das deleções chamadas letais afetam direta ou indiretamente a placenta (Perez-Garcia et al., 2018). Portanto, estudar como a placenta e a capacidade reprodutiva podem estar alteradas em indivíduos geneticamente modificados é de extrema importância para a compreensão dos fatores envolvidos no processo reprodutivo fisiologicamente normal, além de poder fornecer informações valiosas sobre funções gênicas ainda desconhecidas.

Em sua revisão de 2017, Hedge & Srivastava reportaram que animais nocautes para diferentes genes apresentariam defeitos similares em processos celulares regulados por integrinas. A partir disso propuseram, por exemplo, que integrinas estariam associadas à patofisiologia de uma doença congênita que causa cegueira total. Trabalhos como esta revisão, dentre outros, podem auxiliar na elucidação não apenas da função direta de um gene ou das consequências de sua ausência em um tecido específico, mas também de mecanismos e vias associadas a esse gene.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Genes Inflamatórios estuda animais nocautes para o gene *Rasgef1b* de duas maneiras: com deleção completa mediada por CMV-Cre (*Rasgef1b^{fl/fl};CMV-cre*), e com deleção tecido-específica mediada por LysM-Cre (*Rasgef1b^{fl/fl};LysM-cre*), cujo promotor induz atividade tecido-específico de Cre em células mielóides. Ao longo dos estudos do grupo e da manipulação contínua desses animais, notou-se que a linhagem *Rasgef1b^{fl/fl};CMV-Cre* demoravam a engravidar, além de suas ninhadas possuíam poucos filhotes em comparação à linhagem *Rasgef1b^{fl/fl};LysM-Cre* e aos animais WT. A partir de uma parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução, decidiu-se investigar as fêmeas dessa linhagem quanto a aspectos reprodutivos e no contexto de gestação, a fim de encontrar possíveis esclarecimentos acerca dessa situação. Sendo assim, o intuito deste projeto é investigar parâmetros reprodutivos, bem como

caracterizar e avaliar a morfologia da placenta de fêmeas murinas nocaute ou não para o gene *Rasgef1b*, e parâmetros biométricos de suas proles.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. RasGTPases e RasGEFs

A família Ras é uma das cinco principais famílias da superfamília Ras, uma família de proteínas GTPases pequenas (de baixo peso molecular, 21-30 kDa), que desempenham diversas atividades celulares em quase todos os aspectos da biologia celular (Reiner & Lundquist, 2018). Essas proteínas compartilham o domínio para GTPases, mas diferenças na sequência adjacente determinam especificidade estrutural e, conseqüentemente, funcional. Devido a isso, essas proteínas são divididas em famílias e subfamílias. Ras, Rho, Rab, Arf e Ran formam as famílias, que possuem cada qual subfamílias, com um número variado de membros (Wennerberg et al., 2005).

Proteínas da subfamília Ras estão comumente associadas à proliferação celular, enquanto outras subfamílias realizam outras atividades, como adesão celular (Rap), dinâmica e morfologia do citoesqueleto (Rho), tráfego na membrana (Rab), transporte vesicular (Arf), dentre outras (Díez et al., 2011; Liu et al., 2018). Entretanto, por estarem associados a crescimento e diferenciação celular, os genes da família Ras também estão no grupo dos protooncogenes, genes relacionados ao desenvolvimento de tumores (Watari, 1995; Malumbres & Barbacir, 2003; Díez et al., 2011; Stärkel et al., 2012; Simanshu et al., 2017).

Proteínas GTPases, como as da superfamília Ras, estão inativas quando ligadas a GDP, e necessitam de enzimas que realizem a troca GDP-GTP a fim de que se tornem ativas para realizarem suas atividades celulares. Para isso, há uma classe de enzimas chamadas fatores de troca de nucleotídeos guanina (do inglês guanine-exchange factors, ou GEFs), fatores expressos para ativar as proteínas GTPases (Cherfils & Chardin, 1999; Bos et al., 2007). Das várias famílias dessa classe, há a família das RasGEFs, específicas para RasGTPases por apresentarem um domínio de motivo de Ras, chamado REM (do inglês Ras exchange motif) (Bos et al., 2007; Vigil et al., 2010; van Dam et al., 2009). A interação entre Ras e RasGEF para a troca Ras-GDP (inativa) para Ras-GTP (ativa) garante especificidade e é regulada pelo balanço entre GEFs e GAPs, enzimas que realizam a troca inversa (GTP para GDP), retornando assim a RasGTPase à sua forma inativa (Bos et al., 2007; Gloerich & Bos, 2011). Em tumores, esse balanço está desregulado (Coyle & Lim, 2016). A interação entre RasGTPases, GEFs e GAPs está representada na Figura 3:

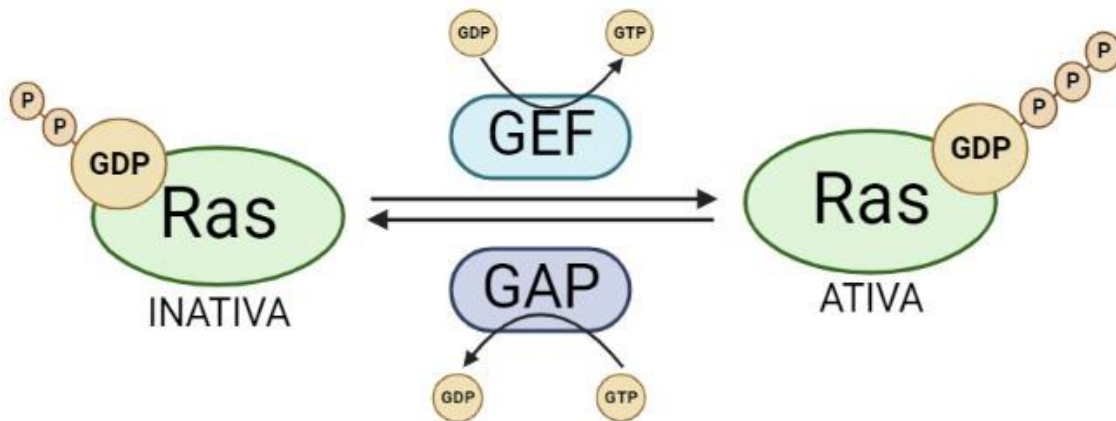


Figura 1: Interação entre RasGEFs e RasGTPases, demonstrando a conversão entre as formas inativas e ativas da superfamília Ras

RasGEFs são fatores de troca de nucleotídeos guanina associados a proteínas Ras. Essas proteínas agem como enzimas trocando a ligação de Ras-GDP para Ras-GTP, tornando a proteína Ras ativa para realizar suas funções celulares. GAPs realizam a troca ao contrário, inativando Ras. Baseado em Bos et al. (2007); Gloerich & Bos (2011). Criado em BioRender.com

A relação de afinidade entre RasGEFs e RasGTPases é cognata (Cherfils & Zeghouf, 2013), o que se traduz em três situações:

- Afinidade com alta especificidade entre um fator RasGEF e uma proteína RasGTPase correspondente;
- Uma proteína RasGTPase que pode ser ativada por mais de um fator RasGEF;
- Vários fatores RasGEF que ativam uma mesma proteína RasGTPase.

O RasGEF C3G, por exemplo, é um dos fatores da proteína Rap1, da subfamília Ras (Ohba et al., 2001). O fator RasGEF1b por exemplo interage com proteínas Ras (Andrade et al., 2010), porém ativa Rap2 (Yaman et al., 2009; Carvalho et al., 2019), uma RasGTPase que é também ativada pelo fator RasGEF1a (Yaman et al., 2009) e pelo fator PDZ-GEF1, que também ativa Rap1 (de Rooji et al., 1999) (Figura 4).

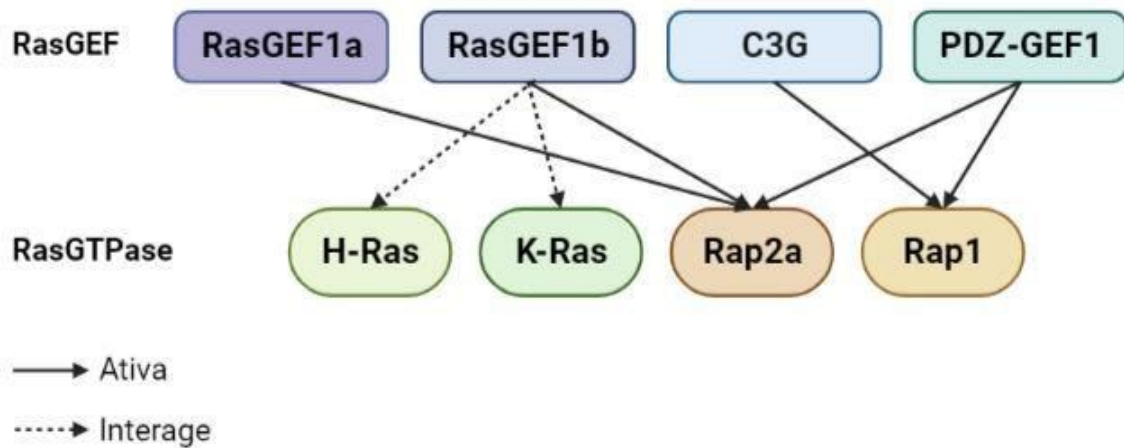


Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de afinidades entre RasGEFs e RasGTPases

RasGEFs podem ter alta especificidade a um RasGTPase ou ativar várias. Da mesma forma, RasGTPases podem ser ativadas por apenas uma RasGEF ou por várias. Baseado em Yaman et al. (2009); Cherfils & Zhegouf (2013).

2.1.1. O gene *Rasgef1b*

Rasgef1b é um gene conservado da família de fatores de troca de guanina das proteínas Ras (RasGEFs), encontrado no cromossomo 5 em camundongos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=320292%5Buid%5D>), e no cromossomo 4 em humanos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/153020>). Esse gene é expresso predominantemente em macrófagos, e sua expressão pode ser também aumentada a partir da ativação de receptores de membrana do tipo Toll (TLRs) e seus sinalizadores intracelulares, como Myd88, e regulada por fatores de transcrição como o NFκB (Leão et al., 2020). O estímulo que induz a expressão do *Rasgef1b* pode provir de patógenos, como o *Trypanosoma cruzi* ou de moléculas bacterianas como o LPS (Andrade et al., 2010; Leão et al., 2020). O fator RasGEF1b possui apenas dois domínios característicos da família RasGEF: o domínio REM, de motivo de troca de Ras, e o domínio catalítico RasGEF (que realizará a atividade de troca de guanina) chamado CDC25 (Mitin et al., 2005; Rojas & Santos, 2006; van Dam et al., 2009; Vigil et al., 2010).

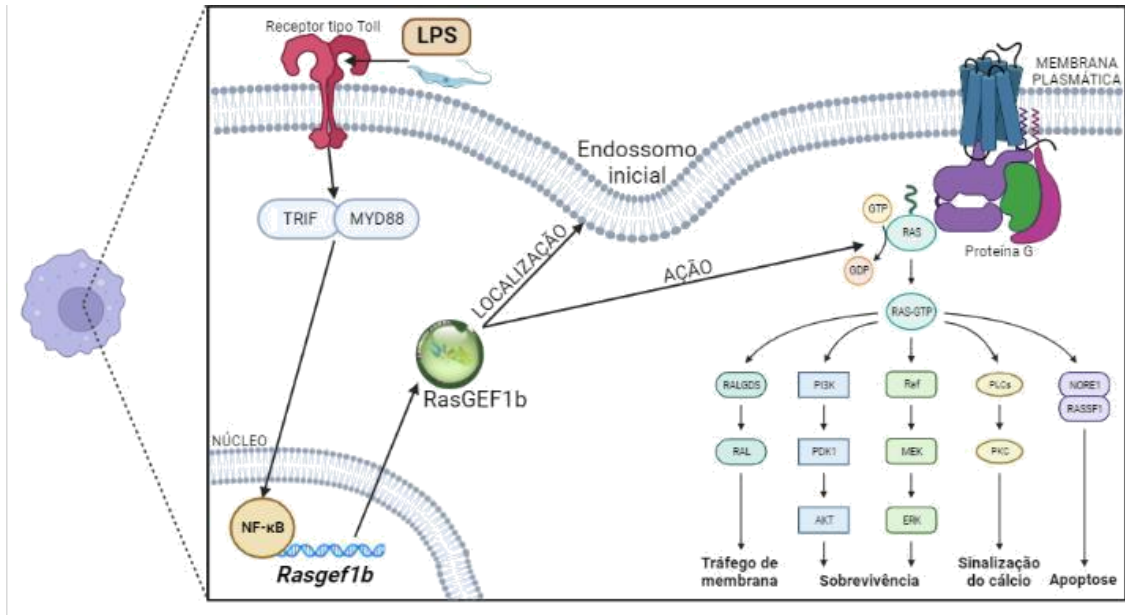


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de transcrição do Rasgef1b

O Rasgef1b é expresso predominantemente em macrófagos, a partir do estímulo de receptores de membrana como TLR2, que convoca sinalizadores como Myd88 para induzir atividade de NFκB para regular sua transcrição. O fator RasGEF1b se localiza nos endossomos iniciais da célula, com atividade para proteínas Ras, especificamente a Rap2a. Baseado em Andrade et al. (2010); Carvalho et al. (2019); Leão et al. (2020).

Embora outros genes de sua família tenham sido elucidados e suas funções sejam conhecidas, o Rasgef1b, especificamente, ainda não teve sua função completamente compreendida. Sabe-se que o fator codificado exibe atividade GEF específica para Rap2 GTPase, mas não para Rap1 ou outros membros da subfamília Ras (Yaman et al., 2009; Carvalho et al., 2019). Foi demonstrado que Rap2a possui ação sobre a resposta imune em macrófagos, modulando a ativação de NF-κB induzida por LPS (Carvalho et al., 2019), e além de estar envolvida na citocinese (Telkoparan et al., 2013), também atua na mediação da interação de células com a matriz extracelular (Meng et al., 2018), e na regulação da adesão celular, do estabelecimento da morfologia celular e da modulação sináptica (Yaman et al., 2009). As potenciais funções neurobiológicas do fator RasGEF1b merecem especial atenção, uma vez que esse gene parece atuar sobre o sistema nervoso central, sendo sua ausência relacionada a distúrbios no desenvolvimento cognitivo, como veremos a frente.

Os achados iniciais envolvendo esse gene o identificaram e caracterizaram em macrófagos estimulados por mucinas e lipopolissacarídeos bacterianos, estudando o ciclo

patogênico do *Trypanosoma cruzi* (Ferreira et al., 2002), e depois no sistema nervoso, em células neurais e na retina por Epting et al (2007), com sua expressão gênica alterada em animais com diferença de expressão de um gene a montante em estudos sobre o desenvolvimento neural por Colasante et al. (2009) e aprofundados por Tao et al. (2019), tendo a regulação de sua expressão associada ao controle da migração interneuronal. Sua expressão é detectável em macrófagos não estimulados e pode ser ainda aumentada por estímulos imunes inatos desencadeados pela ativação do receptor Toll-like (TLR) exigindo o fator de transcrição NF- κ B para indução máxima (Andrade et al., 2010; Leão et al., 2020). Em camundongos, sua expressão parece ser mais abundante no cérebro e no baço, e é aumentada após infecções por protozoários (Andrade et al., 2010). Foi relatado que além do mRNA, um RNA circular (circRNA) de RasGEF1b gerado através de back-splicing dos exons 2 e 4 é detectável e induzido por LPS em macrófagos murinos (Ng et al., 2016).

Em 2010, Andrade et al. localizaram o RasGEF1b em endossomos de macrófagos, estimulado nessas células in vivo e in vitro e interagindo com RasGTPase (Andrade et al., 2010). Sua expressão e atividade em macrófagos já foram observadas não apenas em infecções, mas também em doenças crônicas do metabolismo, tendo sido identificado como um dos genes de perfil pró inflamatório e indutor de estresse oxidativo do transcriptoma global de animais com esteatose hepática induzida (Yang et al., 2017).

O Rasgef1b é encontrado ainda na placenta. Nesse órgão, o gene foi identificado em células da decídua, sendo um dos genes que tiveram sua expressão diminuída em tratamentos para prevenção de partos pré-termo, na combinação entre progesterona e a citocina pró-inflamatória IL-1 β ; a expressão de Rasgef1b foi encontrada 2.7 vezes reduzida na presença dessas duas moléculas (Okabe et al., 2014). O Rasgef1b foi também identificado com um dos fatores potencialmente envolvidos na maturação de células linfocitárias natural-killer (NK), processo essencial para a imunotolerância e uma gestação saudável (Pan et al., 2022). Ademais, análises conduzidas em plataformas de anotação gênica como o BioGPS (<http://biogps.org>) e The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) indicam que o Rasgef1b se encontra expresso, em diferentes níveis, em outros tecidos, como na placenta, com expressão detectável em células trofoblásticas (Jiang et al., 2009), além dos macrófagos e linfócitos. Arenas-Hernandes et al. (2019) relataram que Rasgef1b era um dos genes relacionados a migração celular e resposta imune mais superexpressos em leucócitos residentes na decídua materna comparados a leucócitos circulantes nos vasos maternos, com grupo de leucócitos deciduais expressando o gene 6.4 vezes mais que o grupo de leucócitos circulantes.

Assim como esse gene pode ser deletado do genoma de camundongos para estudos, diversos estudos em humanos relacionados à ausência do fator RasGEF1b já foram realizados, concentrando-se na área clínica, uma vez que sua deleção é parte de uma síndrome genética chamada microdeleção do 4q21, na qual o RASGEF1B e outros genes (entre dois e oito outros genes, a depender do tamanho da deleção) são erroneamente deletados do genoma, levando a profundos prejuízos no desenvolvimento cognitivo e vocal (causando mutismo total ou parcial) e no crescimento (Bonnet et al., 2010; Bhoj et al., 2013; Lebedev et al., 2016). Nos relatos já reunidos na literatura sobre essa síndrome, nenhuma consideração ou observação acerca do status e desenvolvimento reprodutivo foi feita, o que sinaliza uma contribuição valiosa do nosso projeto para os estudos acerca desse fator.

Ademais, o fator RasGEF1b, assim como outros RasGEFs também são alvo de interesse de estudos terapêuticos contra o câncer, uma vez que são expressos e atuam em células imunes. Li et al. (2021) identificaram o RNA enhancer de Rasgef1b expresso em células de câncer de mama e metástase em células ósseas, além de coexpressão desse enhancer com enhancers de outros genes relacionados a atividade imune, indicando um possível papel desses enhancers na tumorigênese e na metástase, além de sugerir que o Rasgef1b possui sua expressão aumentada nessas células tumorais.

A fim de se estudar o gene Rasgef1b, animais nocaute para esse fator foram confeccionados, por meio da técnica Cre-LoxP. Uma vez que essa técnica possui importância para estudos moleculares e possui também considerações quanto ao seu uso para estudos de reprodução, é necessário entender um pouco acerca dessa técnica, para que o objetivo desse estudo seja atendido e a metodologia corretamente executada.

2.1.2. A recombinase Cre e o sistema Cre-LoxP

O sistema Cre/LoxP é uma das principais técnicas de gene targeting desenvolvidas, sendo amplamente utilizada por sua capacidade de gerar nocautes completos e condicionais, com a deleção sendo expressa em um tipo celular, tecido ou região específica (Kos, 2004; Wang, 2009; Shi et al., 2018).

O processo de deleção via Cre/LoxP inicialmente envolvia a tecnologia clássica da engenharia de células-tronco embrionárias (CTE) que eram implantadas a blastocistos seguido de transferência para tubas uterinas de fêmeas, geração de animais quimeras e cruzamentos sucessivos. A recombinase Cre, oriunda de bactérias, era purificada por meio de diversas

técnicas e, por meio de um plasmídeo, era injetada nas CTE implantadas ao blastocisto de camundongos, gerando um animal quimera, cruzado endogamicamente para gerar camundongos expressando a recombinase Cre. Em outra linhagem, um plasmídeo contendo duas regiões LoxP era confeccionado e injetado em CTEs, flanqueando a sequência-alvo – a qual se objetiva deletar – em conformação cis, ou seja, dois lados da sequência-alvo na mesma banda de DNA. Para uma deleção completa, cruzava-se as quimeras contendo LoxP até que ambos os alelos do gene-alvo estejam flanqueados. Posteriormente, era realizado um cruzamento entre um indivíduo Cre e um indivíduo homozigoto contendo o gene-alvo flanqueado por LoxP. A ninhada resultante desse cruzamento expressava assim Cre e possuía a sequência-alvo flanqueada, permitindo que duas moléculas Cre interagissem com cada região LoxP, agindo como uma “tesoura molecular”, clivando uma das regiões LoxP e criando um cordão com o DNA contendo a sequência-alvo, que era retirada (Figura 2). Esse processo pode ocorrer durante G2, na interfase do ciclo celular, logo nas primeiras divisões celulares do zigoto. Sendo assim, os indivíduos nascidos do cruzamento Cre x LoxP nascem com o gene-alvo deletado em todas as células do organismo, sendo classificados como nocaute (KO) para tal (Ghosh & Duyne, 2002; Brault et al., 2007; Bouabe & Okkenhaug, 2015; McLellan et al., 2017).

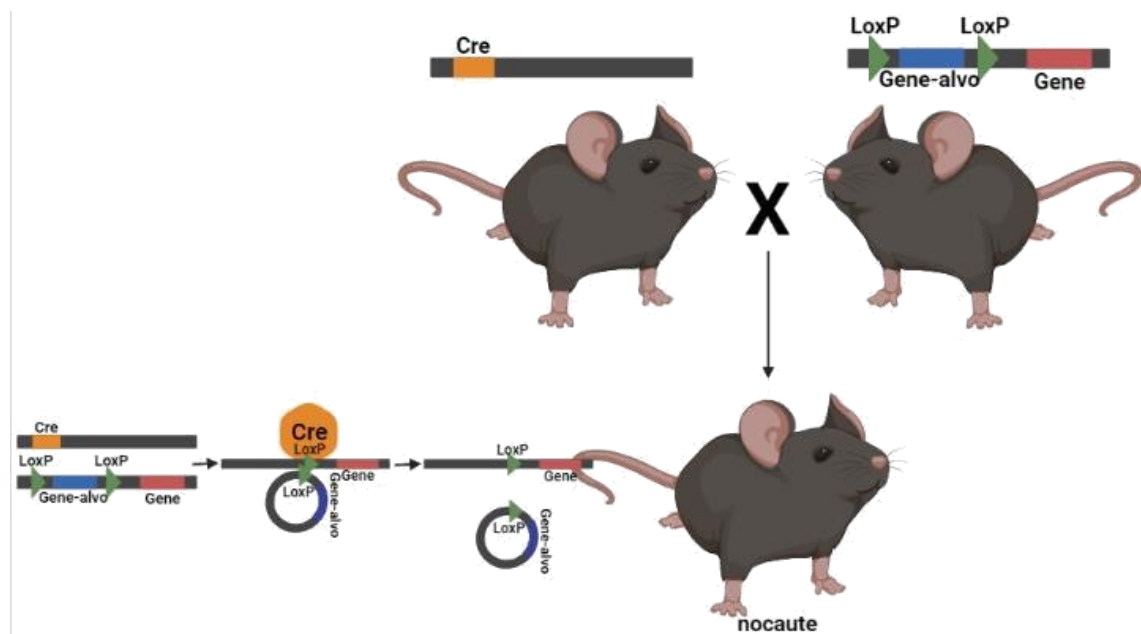


Figura 4: Representação esquemática do cruzamento entre um indivíduo Cre e um indivíduo homozigoto, contendo o gene-alvo flanqueado por LoxP, para obtenção de animal nocaute

Um camundongo que expressa a recombinase Cre e um camundongo que possui o gene-alvo flanqueado por LoxP são cruzados. O fruto desse cruzamento é um camundongo nocaute, pois possuindo Cre e o gene-alvo flanqueado, permite que a recombinase atue interagindo com os sítios LoxP, “cortando” para fora da sequência de DNA o gene-alvo. Baseado em; Bouabe & Okkenhaug (2015); McLellan et al. (2017). Criado em BioRender.com

Embora o sistema Cre/LoxP tenha inicialmente realizado deleções completas, ao longo do tempo essa técnica foi aprimorada para maior eficiência e uso para deletar genes em modo tecido-específico. A partir da década de 1990, técnicas suplementares de engenharia condicional foram aplicadas ao sistema Cre/LoxP (Rossant & Nagy, 1995), permitindo deleções em tipos celulares específicos, além de deleções com controle espacial e temporal, seja com o uso de “interruptores” moleculares de Cre, fármacos que interagem com a recombinase ou promotores ligados a Cre que induzem sua ativação apenas em células específicas (Utomo et al., 1999; Branda & Dymecki, 2004; Kim et al., 2018).

A proteína Cre não precisa de co-fator para agir no DNA, podendo causar recombinações aleatórias (Brault et al., 2007), e até mesmo apresentar atividade citotóxica, estando associado à queda na proliferação celular (McLellan et al., 2017). Apesar disso, a técnica Cre/LoxP continua sendo confiável e prática para produzir animais nocaute para estudos de função de genes e para criação de modelos de patologias humanas. Além disso, o camundongo geneticamente modificado representa um excelente modelo animal para estudos moleculares, pela sua proximidade filogenética ao ser humano (Brault et al., 2007).

2.2. Fertilidade feminina e placenta

2.2.1. Aspectos gerais

O sistema reprodutor feminino dos mamíferos é composto por órgãos internos e externos que sincronizam sua atividade cíclica via hormônios provenientes da hipófise e dos próprios órgãos reprodutivos. Tal sincronia é fundamental para garantir o bom desenvolvimento sexual da fêmea, a produção, maturação e liberação adequada de gameta(s) com qualidade para uma boa fecundação, o sucesso da implantação e invasão do endométrio pelo embrião e o desenvolvimento adequado da placenta, dando origem a fetos saudáveis. A importância desse sistema é indiscutível, considerando que seu funcionamento cíclico demanda uma constante renovação tecidual e alta dinâmica de autorregulação endócrina (Dangelo and Fattini, 2002; Costanzo, 2015; Ross, 2016).

Dentre os órgãos internos do sistema reprodutor feminino, destacam-se ovário, útero e placenta, foco deste estudo. Tal destaque deve-se ao fato de serem os principais participantes da gestação e por regularem a estrutura e a atividade um do outro diretamente. Falaremos brevemente sobre ovário e útero e depois aprofundaremos sobre a placenta.

O ovário é a gônada feminina, responsável pela formação e maturação dos folículos que produzirão e liberarão o oócito maduro (folículo de Graaf), além de produzir os hormônios estrógeno e progesterona, cruciais para o ciclo reprodutivo da fêmea (menstrual em humanos, estral em murinos). Sua atividade é induzida pelos hormônios hipofisários folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), responsáveis pela produção e maturação dos folículos, respectivamente (Dangelo and Fattini, 2002; Costanzo, 2015).

O útero é um órgão ligado à vagina pela cérvix e aos ovários pelas tubas uterinas. Com o formato de Y em camundongos, esse órgão possui três camadas, sendo o endométrio a mais interna e a responsável por alojar o(s) oócito(s) fecundado(s) para o prosseguimento da gestação. Da invasão do endométrio forma-se a placenta, órgão temporário crucial para o desenvolvimento fetal em mamíferos (Dangelo and Fattini, 2002; Ross, 2016).

2.2.2. O ciclo reprodutivo em fêmeas

O ciclo reprodutivo de fêmeas murinas é chamado estral, com duração média de 4-5 dias e é composto por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, com durações que vão de aproximadamente 12 a 48 horas, a depender da fase. Proestro e estro compõem a fase folicular do ciclo, caracterizada por altos níveis de estrógeno e pelo alto desenvolvimento folicular que culmina na liberação do oócito. Já metaestro e diestro compõem a fase lútea do ciclo, na qual o endométrio está receptivo ao blastocisto, os níveis de estrógeno diminuem e os de progesterona aumentam gradualmente devido à formação do corpo lúteo no ovário. Apesar de diminuídos os níveis, o estrógeno também participa da promoção da receptividade uterina ao blastocisto (Hong & Choi, 2018). Caso não haja fecundação, o ciclo retorna para a fase folicular (Wang & Dey, 2006; Croy et al., 2014). No estro, a fêmea fica receptiva ao macho, e a cópula bem-sucedida pode ser detectada por meio do chamado “plugue vaginal”, formado a partir da coagulação do sêmen na entrada da vagina da fêmea (Pang et al., 2014); na ocasião da observação do plugue, considera-se dia gestacional (DG) 0.5. Nesse caso, ou seja, havendo fecundação, o ciclo é interrompido e o epitélio endometrial é preparado para receber o blastocisto (Dey et al., 2004; Croy et al., 2014).

2.2.3. A placenta

2.2.3.1. Formação e morfologia placentária

O zigoto formado a partir da fecundação do óocito sofre diversas clivagens e rearranjos celulares enquanto é conduzido pelas tubas uterinas até o útero, se tornando mórula e logo depois, blastocisto, no DG 3.5 em camundongos. O blastocisto é caracterizado por uma camada superficial de células, o trofoblasto, que engloba um aglomerado de células (embrioblasto) e um vacúolo preenchido por líquido, a blastocele. Assim sendo, o trofoblasto dará origem à placenta, e o embrioblasto, ao embrião (Sutherland, 2003). Entre os dias gestacionais (DG) 4.5 e 7.5, período chamado de “janela de implantação” (Wang and Dey, 2006), o blastocisto se aproxima do endométrio, ocorrendo uma interação molecular que permitirá a invasão do blastocisto no útero, mediado por moléculas de adesão como integrinas e outras proteínas, que se reconhecem na membrana dos trofoblastos e das células epiteliais do endométrio (Modi et al., 2012; Chen et al., 2021).

O processo de implantação possui três etapas: Primeiramente com Aposição, na qual o blastocisto entra em contato físico com o epitélio endometrial; em seguida a Adesão, na qual células e matriz extracelular se reconhecem por meio de moléculas de superfície e são integradas para que a terceira etapa, Invasão, finalmente se inicie (Wang & Dey, 2006; Chen et al., 2021). A invasão é o processo pelo qual as células do trofoblasto degradam o endométrio materno por meio de enzimas para nutrir o embrião, levando ao rearranjo vascular no endométrio e induzindo à decidualização do mesmo, processo importante para a organização da porção materna da placenta, região na qual a maioria das células imunes da placenta se localizarão (Pan et al., 2022), e é de lá que se inicia o desenvolvimento vascular placentário e o abastecimento sanguíneo para o feto (Ashkar et al., 2000; Dey et al., 2004). Com o estabelecimento da interface materno-fetal e o desenvolvimento da decídua e da placa coriônica, a placenta se forma completamente no DG 11.5. A partir daí, cresce em volume e atinge seu tamanho máximo entre os DG 17.5 e 18.5 (Coan et al., 2004; Croy et al., 2014).

A formação desse órgão temporário, embora semelhante entre humanos e murinos, apresenta algumas diferenças quanto a processos envolvidos na implantação e na estrutura final da placenta. Em humanos, na implantação do blastocisto o trofoderma se diferencia em citotrofoblasto, células uninucleadas na parede do blastocisto e sinciciotrofoblasto, formado por células multinucleadas que envolverão o embrioblasto. Ambos os tipos celulares participam

ativamente da invasão do endométrio, que ao final da implantação encobrirá todo o feto e seus anexos. O citotrofoblasto degrada a matriz endometrial que cede espaço ao crescimento do sinciciotrofoblasto, de onde surgem lacunas semelhantes a vacúolos que darão origem às vilosidades coriônicas pela atividade de angiogênese. Em camundongos, a invasão do epitélio endometrial é feita pelas células trofoblásticas gigantes primárias (CTGp) (Croy et al., 2014; Ross, 2016).

A morfologia da placenta varia entre os mamíferos eutérios, de maneira a atender as demandas nutricionais de determinada espécie. Suas características macroscópicas (anatomia), e microscópicas (estrutura, padrão de vascularização e tipode interdigitação) mudam de uma espécie para outra. Em humanos e roedores, por exemplo, a placenta é discoidal e coriônica, uma vez que a interface materno-fetal ocorre em uma área circular delimitada. A placentação de humanos e murinos é ainda caracterizada por um contato direto entre o sangue materno e os trofoblastos da barreira materno-fetal, classificando essa placentação como hemocorial (Burton et al., 2006; Fowden et al., 2015).

Histologicamente, a parte mais distante do feto é chamada decídua materna ou basal, formada por células endometriais com atividade endócrina e células imunes, como as natural-killers uterinas (uNKs), com função imune e angiogênica (Faas & Vos, 2017). A vascularização materna sai da decídua em direção ao labirintotrofoblasto no formato de artérias espiradas envolvidas pelas células trofoblásticas gigantes de canal (CTG-C) (Croy et al., 2014; Figura 6). A partir da decídua, esse órgão possui três regiões em camundongos e duas em humanos:

- Zona Juncional, região avascular, porém atravessada pelos vasos que parte da decídua para o labirinto, formada pelas células trofoblásticas gigantes parietais (CTG-P) e pelo espongiotrofoblasto, tecido de reserva de glicogênio, possivelmente uma reserva energética para contextos de alta demanda energética, como no período final da gestação (Tunster et al., 2020). Essa região não é encontrada na placenta humana, que possui apenas uma camada de células citotrofoblásticas, nas quais se encontram as reservas de glicogênio, delimitando a decídua e o labirintotrofoblasto (Coan et al., 2006).
- Labirintotrofoblasto, camada mais espessa, na qual ocorrem as trocas sanguíneas entre feto e mãe. Esta região é formada por tecido materno e por tecido fetal, e as trocas ocorrem numa rede de capilares que funcionam como barreira entre o sangue materno jorrado da zona juncional e o sangue fetal contido em canais envolvidos por células trofoblásticas gigantes sinusoidais (CTG-S), que com mais três células (Synt I e II e

células endoteliais) formam a membrana interheme. Essa membrana é a barreira e ponte entre sangue materno, com hemácias pequenas e anucleadas, e sangue fetal, com hemácias grandes e nucleadas. O labirinto é uma região dinâmica, que cresce mesmo após afinalização da placenta madura devido à crescente demanda nutricional e energética ao longo da gravidez (Coan et al., 2004; 2005).

- Placa coriônica, a camada basal da placenta, na porção fetal, que se conecta ao cordão umbilical e conduz a circulação fetal (Croy et al., 2014; Ross, 2016).

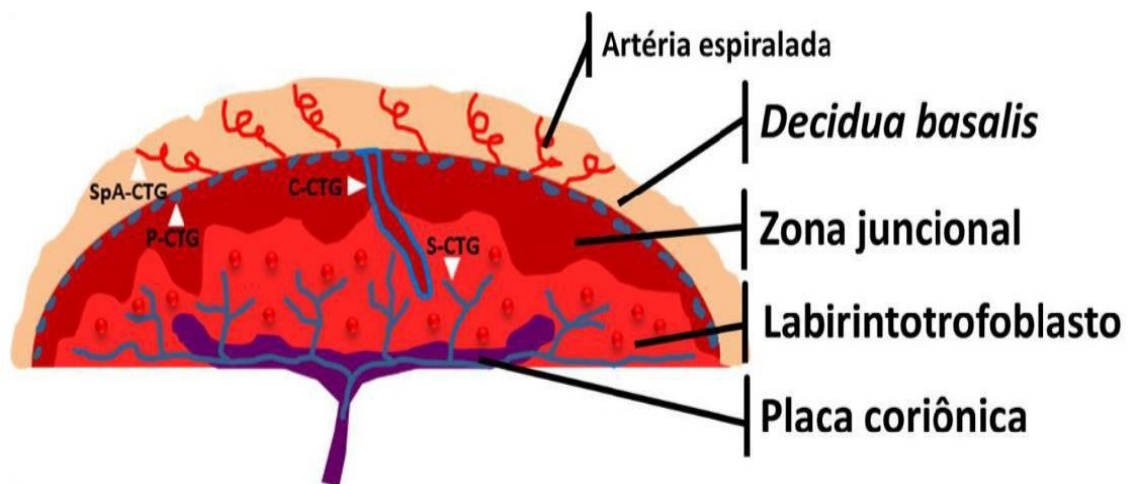


Figura 5: Representação esquemática das camadas placentárias (Felicioni, 2019)

A placenta murina possui quatro camadas, a partir da Decídua basalis ou materna, a zona juncional, o labirintotrofoblasto e a placa coriônica, de onde sai o cordão umbilical. Células trofoblásticas se diferenciam para formar os diversos tipos celulares achados pela placenta, cada qual com sua função.

Por ser um órgão temporário e dinâmico, a placenta necessita de um balanço altamente regulado de processos celulares que garantam sua homeostase ao longo do desenvolvimento fetal, como a angiogênese, crucial para a manutenção e sucesso da gestação (Reynolds et al., 2010), sendo importante de tal modo que tipos celulares todas as camadas da placenta produzem fatores angiogênicos, de células trofoblásticas a células imunes (Plaisier et al., 2007; Faas & Vos, 2017). Outros processos celulares também são importantes para a manutenção da homeostase placentária, como a proliferação celular (Unek et al., 2017), regulada por KI67, presente durante o ciclo celular atuante na movimentação e distribuição da cromatina, na manutenção da integridade dos cromossomos e no processamento de RNAr (Sun & Kaufman, 2018), morte celular por apoptose, processo regulado por Caspases e que não induz resposta inflamatória (Carvalho, 2007), e a autofagia, processo catalítico de reciclagem celular de

componentes celulares a partir de estímulos intracelulares ou ambientais (Oh & Roh, 2017), atuante também na mediação do crosstalk com apoptose na placenta e na regulação da imunidade nata e adquirida e do crosstalk imune materno-fetal (Bildirici et al., 2012; Zhao et al., 2020; Carvajal et al., 2021). Juntos, esses processos mantêm um desenvolvimento regulado desse órgão.

2.2.3.2. Imunidade placentária e macrófagos

O crosstalk materno-fetal é de grande importância para o desenvolvimento fetal, uma vez que a gravidez gera resposta inflamatória e o estabelecimento da imunotolerância em equilíbrio com a defesa do organismo é crucial para o prosseguimento adequado da gravidez (Negishi et al., 2018). As principais células imunes presentes na placenta são as natural killers, as células dendríticas e os macrófagos. As natural killer são as principais, sendo diferenciadas no processo de imunotolerância, perdendo sua atividade citotóxica e apresentando atividade endócrina, sintetizando citocinas e fatores do crescimento.

Os macrófagos representam cerca de 20% das células leucocitárias na decídua, e estão em sua maioria regulados na conformação M2, também produzindo citocinas e participando da reciclagem celular. Ambos os tipos celulares possuem função angiogênica na placenta, sendo as uNK envolvidas na regulação da invasão trofoblástica. Os macrófagos estão presentes no miométrio murino, e um dos seu subtipos (Mrc1), envolvido com angiogênese e remodelação vascular, aumenta em número drasticamente no processo de decidualização, sendo importante participante da implantação ao regular a formação das artérias espiraladas (Erlebacher, 2013; Faas & Voz, 2017, Negishi et al., 2018; Pan et al., 2022).

Ao longo do desenvolvimento da placenta, populações de macrófagos de origem materna povoam o labirintotrofoblasto, com função angiogênica e de imunotolerância. Entretanto, o feto também produz uma classe de macrófagos, chamada células de Hofbauer, que se localizam nos vasos fetais, com função angiogênica e de desenvolvimento da imunidade inata, além de serem responsivas a estímulos em receptores de membrana do tipo Toll (Thomas et al., 2021; Freyer et al., 2022).

2.2.3.3. Importância biológica da placenta e crescimento fetal

A placenta é um órgão vital no desenvolvimento intrauterino de mamíferos, pois estabelece uma interface entre o feto e a mãe, sendo o local de trocas gasosas, de nutrientes e

substrato energéticos, além de receber as excreções do feto (Alvino, 2009; Vanderley & Santana, 2015). Esse órgão temporário também funciona como barreira protetora do feto contra patógenos e toxinas, além de possuir função endócrina, uma vez que sintetiza hormônios importantes para a adaptação fisiológica materna, promovendo manutenção adequada da gestação e do desenvolvimento fetal (Ross, 2016; Tunster et al., 2020). A importância da interface materno-fetal não está só na função da placenta; seu desenvolvimento está intimamente atrelado ao desenvolvimento fetal, e genes importantes para a estrutura placentária também são determinantes em diversas estruturas fetais (Rossant & Cross, 2001).

A partir do momento em que a placenta é formada, sua nutrição é proveniente da placenta, e é por meio desse órgão que o feto interage com o organismo materno (Burton & Fowden, 2015). O aporte sanguíneo placentário adequado é crucial para o pleno desenvolvimento do indivíduo, que cresce de maneira proporcional e saudável (Salam et al., 2014), uma vez que o crescimento fetal possui alta demanda por ser tão rápido e regularizado (Hoffman et al., 2021). Diversos distúrbios metabólicos e retardos no crescimento morfofisiológico possuem origem placentária, como a Restrição Intrauterina de Crescimento (RIUC), que, por insuficiência placentária causada por má formação, lotação intrauterina, dentre outras, induzem a reprogramação fetal e consequentemente causam alterações crônicas para o feto, que perduram na vida pós-natal com consequente predisposição a doenças crônicas e disfunções metabólicas, como baixo peso ao nascer e crescimento retardado, síndrome metabólica, sobrepeso, diabetes tipo 2 e outros (Ross & Desai, 2013; Sharma et al., 2016; Sun et al., 2020). Além disso, problemas placentários induzem a doenças que comprometem a gestação e a viabilidade fetal, como pré-eclâmpsia e diabetes mellitus (Unek et al., 2017).

As atividades realizadas pela placenta garantem não só sua sobrevivência como também seu desenvolvimento adequado, mesmo em contextos adversos. Um estudo realizado por Guillemot et al. (1994) demonstraram a capacidade de uma placenta saudável de manter fetos com condições genéticas letais, recuperando parâmetros de seu desenvolvimento. A placenta também redireciona nutrientes para o feto e o protege de sobrecargas nutricionais, mantendo seu crescimento normal, como demonstrado por Shrestha et al. (2022), estudando a relação entre indivíduos com diferentes níveis de expressão de adiponectina e dieta normo ou hiperlipídica.

Embora a placenta possua capacidade de manter o feto mesmo em condições prejudiciais ao desenvolvimento e protegê-lo de agentes nocivos, por ser tão crucial ao

desenvolvimento fetal, esse órgão também é extremamente sensível a distúrbios genéticos (Rossant and Cross, 2001). Malformação e/ou ineficiência em alguma das atividades que a placenta realiza podem gerar consequências fisiológicas permanentes para o feto ou até mesmo inviabilizar seu desenvolvimento, levando ao aborto, e diversos estudos vêm demonstrando isso: hipóxia altera a expressão do fator VEGF, levando à má vascularização na placenta e também no feto, que morre (Kozak et al., 1997).

2.2.3.4. RasGEFs e vias ativadas por Ras no contexto reprodutivo e no desenvolvimento placentário

As cascatas de sinalização celular iniciadas pela família Ras são cruciais para o funcionamento adequado do organismo, portanto entender o papel que essas proteínas cumprem no desenvolvimento placentário e na fertilidade feminina nos auxiliam a compreender melhor os mecanismos de ação dessas proteínas e a identificar possíveis problemas reprodutivos para estudá-los.

Sabe-se que alguns RasGEFs pontuais estão relacionados ao desenvolvimento placentário, porém as informações sobre essas enzimas nesse órgão são escassas. O RasGEF Sos1 foi identificado como essencial para o desenvolvimento embrionário, por seu papel na via de sinalização de fatores de crescimento, levando a letalidade fetal no meio da gestação, ao contrário do seu homólogo Sos2, que não cumpre papel do desenvolvimento embrionário (Wang et al., 1997; Esteban et al., 2000). Luo et al. (2021) acompanharam a cinética de expressão gênica ao longo do desenvolvimento placentário inicial de caprinos, e descobriram as GEFs RapGEF1, 3 e 4, associadas à Rap1, apresentando aumento de expressão, com RapGEF3 quase dobrando a quantidade de mRNA presente no tecido no começo da formação do órgão. O estudo sugere um papel importante da Rap1 na regulação do crescimento placentário e de funçõespotenciais de RasGEFs nos trofoblastos. Assim, aos poucos se começa a investigar essas enzimas no contexto reprodutivo.

A proliferação celular é a principal atividade acionada pela sinalização partida das proteínas Ras, e está presente em diferentes aspectos da reprodução feminina, como no desenvolvimento folicular, ovulação e função lútea nos ovários (Fan et al., 2012; Billhaq & Lee, 2021), e no desenvolvimento embrionário (Roperto et al., 2017). Uma proteína Ras foi identificada na granulosa de folículos ovarianos, envolvida com o desenvolvimento folicular até a ovulação; entretanto formas mutadas dessa proteína estavam associadas ao

desenvolvimento de tumores ovarianos (Fan and Richards, 2010). Isso é esperado, uma vez que genes associados a proliferação celular são potenciais oncogenes quando desregulados em sua expressão ou alterados em sua estrutura (Díez et al., 2011).

Na placenta, foco deste estudo, RasGTPases foram associadas a inibição de apoptose, e na promoção de proliferação celular de trofoblastos (Yang et al., 2006; Hambruch et al., 2010; Liu et al., 2018). A proliferação e migração celulares induzidos pela via de sinalização de Ras são importantes para o desenvolvimento placentário, e a via está diminuída em problemas reprodutivos como os que causam abortos espontâneos recorrentes inexplicados (Zhang et al., 2021). A sobrevivência de células-tronco do mesênquima placentário é de extremo interesse não apenas para o desenvolvimento adequado do feto, mas também para estudos de terapia regenerativa, que encontraram nessas células excelente fonte de mecanismos terapêuticos (Kim et al., 2019). Outras atividades ativadas pela sinalização Ras também possuem importância em aspectos estruturais da placenta. A modulação entre migração e adesão celular em trofoblastos é regulada por uma rede de sinalização da qual Ras participa (Roseweir & Millar, 2012). Ademais, a adesão celular, crucial para que a implantação ocorra de maneira correta e segura, possui regulação da via de sinalização Ras, aumentando a receptividade do endométrio e facilitando o sucesso da implantação (Chen et al., 2021), possivelmente por meio de proteínas Ras presentes no útero e reguladas por estrogênio (Hong & Choi, 2018).

2.2.3.5. Animais nocaute e placenta

A deleção de um gene pode gerar efeitos secundários não relacionados, dentre eles a diminuição na fertilidade. Vasudevan et al. (2009) compararam, na mesma linhagem, camundongos selvagem (WT) e nocaute (KO) para genes não relacionados à reprodução e descobriram que em algumas linhagens a taxa de fecundação era até 50% menor em camundongos KO. O estudo ainda relata outros achados acerca de letalidade embrionária, e espermatozoides anormais em animais transgênicos (Vasudevan et al., 2009 apud Covarrubias et al., 1987; Magram & Bishop, 1991). Adicionalmente, o estudo comenta sobre impactos da endogamia, muito presente em linhagens isogênicas e nocautes, sobre espermiogênese, ovulação, e desenvolvimento embrionário (Vasudevan et al., 2009 apud Scott & Whittingham, 1996; Spearow & Barkley, 1999).

No estudo de Rossant & Cross (2001), diversos genes relacionados ao desenvolvimento e à função placentária foram investigados, por meio de modelos animais transgênicos, e

catalogados quanto ao aspecto placentário estavam relacionados, seja a vascularização do labirinto, a diferenciação do trofoblasto, dentre outros processos. Foi relatada também a íntima relação entre a genética placentária e o desenvolvimento embrionário/fetal, em como a formação da placenta influencia a integridade e o crescimento do organismo na gestação e a saúde materna. Outros estudos com nocautes para genes placentários foram realizados desde então, para descoberta de função e regulação e elucidação de distúrbios placentários. Entretanto, considerando a forte interação entre desenvolvimento placentário e embrionário/fetal, genes que não estão diretamente relacionados à formação e atividade da placenta podem alterar sua estrutura e função direta ou indiretamente (Rossant & Cross, 2001 Shi et al., 2004).

Cerca de um terço dos genes é essencial para a vida, e suas deleções resultam em letalidade para o embrião em desenvolvimento (Brown & Moore, 2012; Dickinson et al., 2016). Um estudo conduzido por Perez-Garcia et al. (2018) relatou que quase 70% das deleções que causam letalidade a partir do meio da gestação estavam relacionadas a distúrbios placentários, e que letalidade precoce estava sempre associada a malformação placentária severa. Há uma alta correlação entre problemas placentários e formação irregular do sistema vascular e do cérebro. Além disso, diversos genes que são essenciais para a vida participam também do desenvolvimento do trofoblasto, por exemplo (Perez-Garcia et al., 2018).

Essa relação indireta entre genes essenciais ou não para a vitalidade e o desenvolvimento placentário foi observada em outros estudos. A retirada do gene que codifica a aquaporina, por exemplo, causou, além das já esperadas disfunções circulatórias e nefrológicas, alterações na função placentária e no desenvolvimento embrionário, embora não leve à morte (Hua et al., 2019). [Kopeć et al. \(2021\)](#) demonstraram como a ausência de diversos genes relacionados ao metabolismo do ferro impactam o desenvolvimento pré-natal, no processo de implantação e placentação, e como isso se relaciona à letalidade que essas deleções geram, assim como Rantakari et al. (2008), estudando as consequências da deleção do gene HSD17B2.

A família Ras ativa cascatas de sinalização que efetuam proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Colicelli, 2004). Deleção de alguns dos seus fatores de troca, responsáveis pela sua ativação, causou letalidade embrionária relacionada ao pobre desenvolvimento e diferenciação trofoblástica nas camadas funcionais da placenta (Qian et al., 2021), assim como deleção de proteínas upstream a proteínas Ras no complexo de sinalização, e que a convocam mediante estímulo e que se ligam a ela, também geraram letalidade, por meio da inibição da sobrevivência celular e apoptose descontrolada (Yang et al., 2016), ou levar ao

crescimento retardado, com consequências até o desenvolvimento pós-natal (Cianfarani et al., 2007). Contudo, estudos presentes sobre as consequências da deleção de algum membro da família Ras ou de algum de seus fatores e precursores na placentação e desenvolvimento uterino ainda são escassos.

Apesar da evidente importância do estudo da placenta e de sua relação com o desenvolvimento embrionário em animais nocaute, essa área de interesse tem sido negligenciada em estudos moleculares, que em sua maioria e focam apenas no embrião/feto, não incluindo os tecidos extraembrionários. Isso resulta numa identificação das possíveis causas de letalidade drasticamente abaixo da realidade. Portanto, investigações placentárias poderiam gerar um panorama completo da compreensão do papel de um gene específico para o desenvolvimento pré-natal (Cao & Fleming, 2016; Perez-Garcia et al., 2018; [Kopeć et al., 2021](#)).

3. HIPÓTESE

Este projeto trabalha com a hipótese de que a deleção do gene *Rasgef1b* afeta parâmetros reprodutivos de fêmeas murinas, bem como o desenvolvimento morfológico placentário.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar parâmetros reprodutivos e caracterizar a morfologia placentária em fêmeas gestantes *RasGEF1b-cKO*.

4.2. Objetivos específicos

Sempre comparando fêmeas do tipo selvagem (WT) e *RasGEF1b-KO* (KO), os objetivos específicos foram:

- Observar o ciclo estral, a duração de suas fases e sua proporção;
- Investigar a média de acasalamentos até prenhez por grupo;
- Contabilizar o número de fetos/embriões viáveis e o número de mumificações nos sítios de implantação;
- Realizar a biometria de placentas e fetos no período gestacional tardio pré-termo (dia gestacional 17.5);
- Avaliar, por meio de análises histomorfométricas, componentes estruturais placentários.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Comitê de ética

Este estudo teve seu protocolo submetido e aprovado pelo CEUA: 187/2021.

5.2. Animais e design experimental

Seis fêmeas e três machos C57BL/6 WT e seis fêmeas e três machos C57BL/6 RasGEF1b-cKO (Rasgef1bfl/fl;CMV cre) - nocaute para Rasgef1b, as fêmeas a partir de 12 semanas e os machos a partir de 15 semanas, foram selecionados aleatoriamente para análises comparativas. Os grupos foram definidos a partir do perfil genético dos animais, sendo dois grupos experimentais: selvagem (WT) e nocaute (KO). Os animais foram mantidos no biotério de camundongos da Morfologia, situado no bloco N2-246, no ICB-UFMG, biotério com sistema de ventilação moderno, com escapamentos de ar dispostos ao longo das prateleiras, permitindo assim que os animais fossem mantidos em caixa aberta. As condições dos animais ainda incluíram água e ração ad libitum e regime de 12h claro/12h escuro. Os machos foram mantidos em caixas separadas, mas as fêmeas foram mantidas juntas em uma caixa.

Camundongos transgênicos contendo os alelos de Rasgef1b com a deleção em células germinativas e somáticas (Rasgef1bfl/fl;CMVcre; abreviados RasGEF1b-cKO) – todos em background C57BL/6 – foram gerados por Silva e colaboradores (Laboratório de Genes Inflamatórios, ICB/UFMG, Silva AM, 2022 – comunicação pessoal). Os camundongos eram monitorados regularmente quanto ao seu genótipo através de PCR a partir de DNA genômico obtido da cauda dos animais. Brevemente, o DNA obtido era usado como molde para a amplificação da região gênica de Rasgef1b alvo da recombinação alélica provocada pela recombinase Cre em reação de PCR contendo 2pmoles dos oligonucleotídeos P1: 5'-CCAAGAGCAGAGTGAAACATGC- 3' e P4: 5'-AGGTGTGTAAATGGCCACTGAG-3', em reação contendo tampão (PCR Buffer I0, Phoneutria), 1,5 mM de MgCl₂ (Phoneutria), 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen) e 1U de TaqDNA polimerase (Phoneutria). As reações eram incubadas em termociclador MyCycler™ (Bio-Rad), com as seguintes condições termocíclicas: desnaturação à 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 2 min 15 s e extensão final de 3 min a 72°C. Os fragmentos amplificados eram fracionados em gel de agarose 1,5%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich). Os géis eram visualizados em transluminador de luz UV.

Os camundongos selvagens (WT) foram obtidos do Biotério Central do ICB (bloco B3) com seis semanas de idade, e foram mantidas no biotério da Morfologia para aclimação até completarem 12 semanas, quando os experimentos da metodologia se iniciaram. Da mesma forma, os animais nocaute (KO) foram transferidos do biotério de Experimentação para o biotério da Morfologia, para aclimação junto aos camundongos WT. Machos foram mantidos separados, em caixas individuais (20x30x15cm), enquanto as fêmeas foram mantidas juntas, em caixas grandes (40x30x18cm), sendo uma caixa para fêmeas WT e outra caixa para fêmeas KO.

O design experimental deste projeto foi concebido a fim de se cumprir todos os objetivos específicos em três etapas determinadas, como se pode observar na Figura 6.



Figura 6: Design experimental do projeto

Fêmeas de 12 semanas de idade, WT ou KO, tiveram seus dados e material coletados em 3 etapas, para se atender aos objetivos específicos do projeto

5.3. Acompanhamento do ciclo estral e tentativas de acasalamento

Para a investigação do ciclo estral, as fêmeas de ambos os grupos experimentais tiveram a abertura vaginal lavada com 50µl de tampão fosfato (0,05M, pH 7,3), em movimento de “flush” repetido. A obtenção do lavado vaginal foi realizada diariamente por duas semanas consecutivas, em dois horários: pela manhã (9-11h) e à tarde (15-17h). Os lavados foram então analisados ao microscópio óptico para classificação das fases do ciclo. Ao final dos 14 dias, uma tabela foi montada com a identificação das fêmeas e o estágio de cada turno de cada dia. A contagem dos ciclos estrais considerou o início de um ciclo quando se observava um proestro ou um estro, e o final do ciclo um diestro. A Figura 7 demonstra as quatro fases do ciclo estral analisadas.

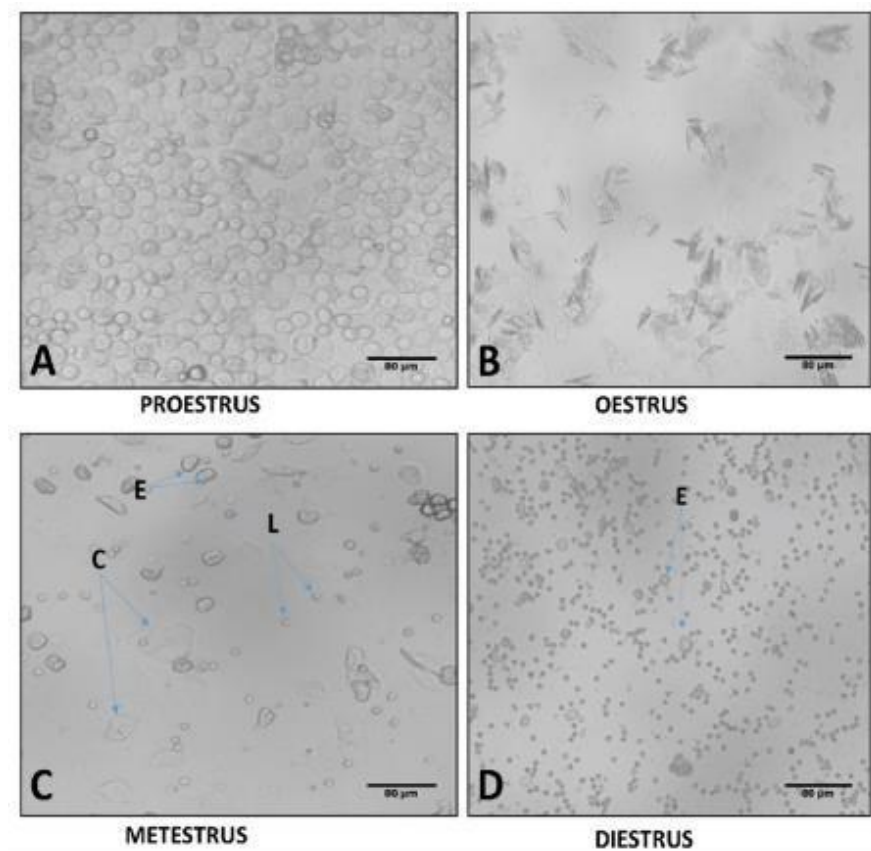


Figura 7: Lavado vaginal de fêmeas murinas (Croy et al., 2014)

O ciclo estral de camundongos consistem em quatro fases, marcadas pelos tipos celulares predominantes: A: Proestro, com predomínio de células epiteliais (esféricas e grandes). B: Estro, com predomínio de células cornificadas (em aspecto de “folha seca”). C: Metaestro, com células cornificadas e epiteliais e ainda com leucócitos (esféricas e pequenas), e D: Diestro, com predomínio de leucócitos.

As tentativas de acasalamento foram iniciadas após as duas semanas de análise de ciclo estral. Na presença de estro, a fêmea era colocada, ao final da tarde, na caixa contendo um macho de seu mesmo grupo, sendo assim os acasalamentos homocigóticos (macho WT x fêmea WT / macho KO x fêmea KO). No dia seguinte, pela manhã, a fêmea era recolocada em sua caixa original e a presença de plugue vaginal (evidência de cópula) era examinada. Com a confirmação do plugue, considerava-se dia gestacional 0.5 e a fêmea era então pesada periodicamente até o dia da eutanásia, para que se certificasse de que a fêmea estaria gestante e a eutanásia não seria desnecessária. Devido à observação de que a linhagem RasGEF1b-cKO apresentava ninhadas pequenas, além de maior dificuldade de prenhez, as datas dos acasalamentos foram marcadas e depois as tentativas foram computadas. Esse foi um ponto

crítico do trabalho, uma vez que esse estudo se originou a partir da observação desse fenômeno na reprodução dessas fêmeas nocaute.

5.4. Procedimentos da eutanásia

As eutanásias foram definidas para o dia gestacional 17.5, pois é a fase na qual a placenta, órgão principal deste estudo, está em seu tamanho máximo, segundo Croy et al (2014). Na ocasião da eutanásia, as fêmeas foram previamente anestesiadas por meio de associação entre xilazina e cetamina (8 mg/kg e 80 mg/kg, respectivamente) e após alguns minutos, eutanasiadas por meio de deslocamento cervical. Em seguida realizou-se laparotomia da cavidade abdominal das fêmeas, com exposição dos cornos uterinos. Estes foram dissecados, sendo o número de fetos e de mumificações (fetos em estágio pós-implantação cujo desenvolvimento foi interrompido, geralmente por baixa placentação, e regrediram, por reabsorção, a uma pequena massa escura esférica coberta pelo tecido uterino) contabilizado, e mensuradas as biometrias dos fetos (peso e comprimento cabeça-cauda) e das placentas (diâmetro médio), tal como estabelecido nos objetivos específicos. Dos fetos foi obtido o comprimento cabeça-cauda por meio do paquímetro digital. Utilizando balança de precisão, obtiveram-se os pesos corporais, e os pesos dos cérebros e dos fígados para cálculo da razão peso cérebro/peso fígado, indicador de crescimento fetal adequado. As placentas foram pesadas, sendo obtidas, por meio de paquímetro digital, as medidas de diâmetro (longitudinal e transversal), para o cálculo do diâmetro médio. Além do peso absoluto, a relação entre peso feto/ peso placenta foi obtida para cálculo de eficiência placentária, indicador de crescimento e função placentárias adequados.

Ao final do experimento, quando as seis fêmeas de cada grupo já haviam sido obtidas, os três machos de cada grupo foram eutanasiados, seguindo o mesmo protocolo da eutanásia das fêmeas. Seu peso corporal foi medido, e em seguida os testículos foram expostos por laparotomia na cavidade abdominal. Os testículos esquerdo e direito foram coletados, pesados e selecionados para análises diversas: ¼ fixado em paraformaldeído, para análises de imunohistoquímica; ¼ fixado em glutaraldeído, para análises histomorfométricas; ¼ submerso em RNA later por 24h e posteriormente mantido a -20°C, para análises moleculares; e ¼ congelado a -20°C, para sonicação (contagem de espermatozoides).

5.5. Coleta de material biológico

A placenta foi o órgão de interesse desse estudo, pois análises in silico indicam que há expressão do RasGEF1b nesse órgão (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=320292>, acessado em 21/11/2022; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3142:1454742> at, acessado em 21/11/2022; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3113:131473>, acessado em 21/11/2022). Sendo assim, placentas foram coletadas de todas as fêmeas, e fixadas em Glutaraldeído 4% –metade das placentas -, ou Paraformaldeído 4% - metade restante das placentas. As placentas foram seccionadas transversalmente ao meio para uma melhor penetração do fixador. Após 24 horas, os fixadores foram descartados e as amostras foram armazenadas em tampão fosfato (0.05M – pH7.3), e mantidas a 4°C até o processamento para confecção de lâminas histológicas.

5.6. Processamento do material

As placentas fixadas em paraformaldeído foram desidratadas em proporções crescentes de álcool, depois perfundidas com xilol e então incluídas em banhos parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo semiautomático a 5µm de espessura com secção semi-seriada, com intervalos de 5 cortes para a placentas. As secções transversais obtidas foram coradas em bateria de coloração em Hematoxilina-Eosina, que consiste na retirada de parafina por banhos de xilol, seguida da hidratação do corte por concentrações decrescentes de álcool e finalmente água, para em seguida a coloração com hematoxilina, depois eosina, e posteriormente a desidratação do corte por meio de banhos com concentrações crescentes de álcool e por fim xilol, para adesão ao meio de montagem. As lâminas histológicas prontas foram então fotografadas para as análises histomorfométricas. As placentas fixadas em glutaraldeído foram desidratadas em proporções crescentes de álcool, sendo posteriormente incluídas em resina glicol metacrilato.

5.7. Análises histomorfométricas placentárias

As lâminas histológicas contendo cortes de placenta coradas em Hematoxilina-Eosina foram fotografadas em microscópio acoplado à câmera fotográfica (OLYMPUS BX51 e câmera digital da Q-color 3), e as fotomicrografias para análises de proporção volumétrica, espessura da membrana interheme, diâmetro de vasos fetais e área de espaços sinusoidais e densidade celular foram, com o uso do software QCapture, em aumento de 80x (40x da objetiva multiplicado por 2x da projetiva da câmera). Para a mensuração de camadas da placenta, foi

utilizada lupa Zeiss Microscopy GmbH (Konigsallee 9-210 acoplada à câmera fotográfica (Axlocam 105 color) da Zeiss, no aumento de 1.65x, no laboratório de Sistemática Vegetal, no ICB. Com as fotomicrografias obtidas, as análises foram feitas em notebook pessoal utilizando o software ImagePro Plus. Os parâmetros avaliados foram:

- Mensuração da área das camadas de interesse da placenta, a saber: zona juncional, labirintotrofoblasto e placa coriônica. A mensuração foi realizada com fotomicrografias em 1,65x de aumento, ampliadas com zoom. A calibração foi feita a partir da régua gerada pelo software da câmera, e as mensurações foram feitas em ‘mão livre’ no Image Pro Plus, e a identificação visual das camadas foi feita a partir das descrições histológicas de Croy et al. (2014) e Ross (2016). Tomou-se por referência a presença da artéria central em pelo menos três fotomicrografias por animal (Figura 7A);
- Point-counting para determinar a proporção volumétrica das estruturas no labirintotrofoblasto e no espongiotrofoblasto, com fotomicrografias em 80x de aumento e ampliadas uma vez. A gráticula possuía linhas verticais e horizontais com intervalos de 110 e 130 μm , respectivamente, totalizando 110 pontos. Descartando-se os pontos caídos em artefatos, estabeleceu-se as categorias:

o Labirintotrofoblasto: Espaços sinusoidais maternos, capilares fetais e membrana hemato-placentária. Análises foram feitas em oito fotos por animal (Figura 7B).

o Espongiotrofoblasto: Células trofoblásticas gigantes ou endócrinas, células produtoras de glicogênio e vasos sanguíneos. Análises foram feitas em quatro fotos por animal.

- Mensuração da espessura da membrana interheme, uma vez que sua espessura nos fornece informações sobre a eficiência da troca materno-fetal (Montenegro & Filho, 2015). As análises foram realizadas ampliando as fotomicrografias duas vezes pelo zoom, e a espessura era medida no trecho mais delgado da membrana, utilizando-se a ferramenta de ‘traço reto’ do software, que nos fornecia o comprimento mensurado (Figura 7C);

- Mensuração da área média dos vasos fetais, delimitados por células endoteliais, e comparação da quantidade de vasos de diferentes áreas entre os grupos, para avaliar o arranjo vascular dessas placentas. A área foi mensurada por meio da ferramenta ‘mão livre’, a mesma usada para mensurar área das camadas, e foi feita em fotomicrografia também ampliada em zoom. A mensuração observava a presença de células endoteliais delimitando o lúmen e a presença de hemácias fetais, grandes e eletrodensas por ainda possuírem núcleo, e foi feita apenas na delimitação do endotélio. Para a comparação de quantidade de vasos de diferentes áreas, categorias que abrangiam as menores áreas e as maiores foram estabelecidas em intervalos de 100 em 100 μm^2 inicialmente, e depois com intervalos crescentes, sendo assim cinco categorias: 50-100; 101-200; 201-300; 301-500; 501-1000 μm^2 .

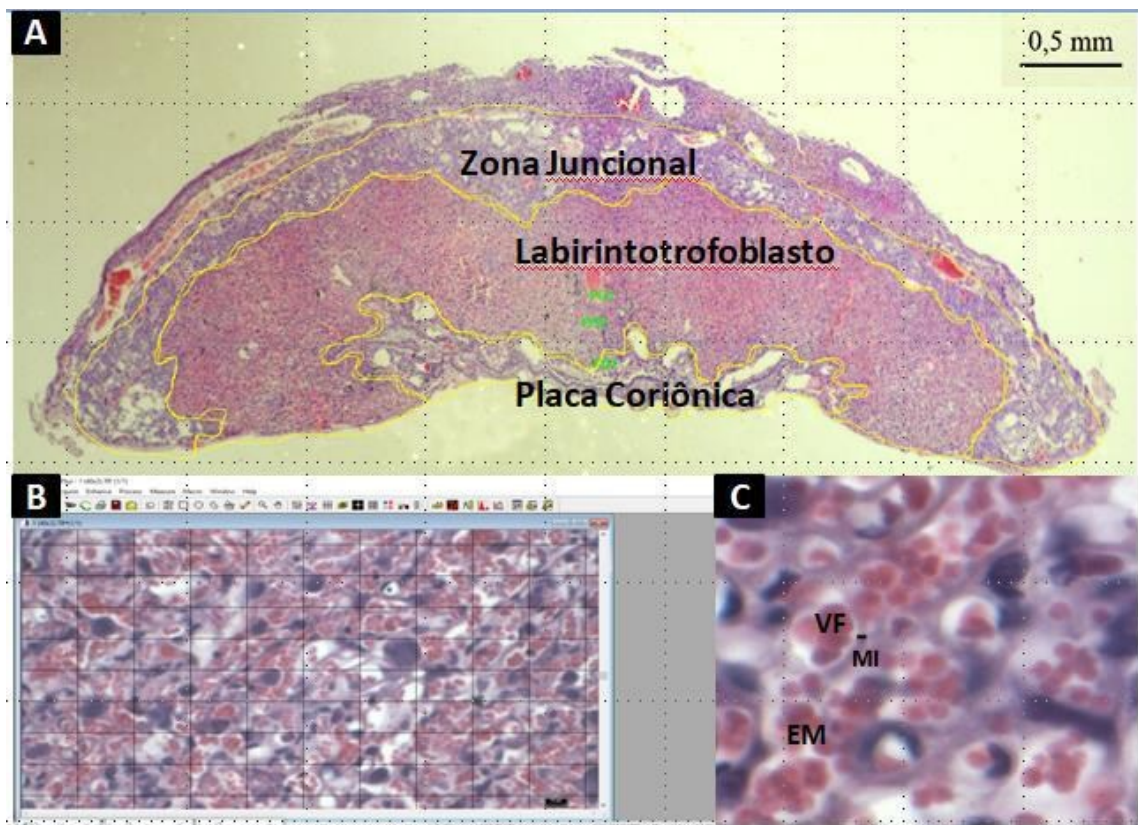


Figura 8: Análises histomorfométricas placentárias

Fotomicrografias de placenta para análises de caracterização morfológica. A: Placenta inteira em corte transversal, vista em aumento de 1,65 vezes. Pode-se distinguir as camadas placentárias, que tiveram sua área mensurada usando o software Image Pro Plus. B: Fotomicrografia do labirintotrofoblasto em aumento de 80

vezes com grátula para a realização do point-counting para avaliação de proporção volumétrica de componentes placentários. C: Fotomicrografia de labirintotrofoblasto (aumento de 80 vezes) ampliada com zoom, possibilitando a mensuração da espessura da membrana interheme (MI), da área dos vasos fetais (VF), além de observarmos com detalhes o espaço materno (EM), onde o sangue jorrado se localiza.

5.8. Análises estatísticas

Todas as variáveis medidas foram testadas quanto à normalidade antes da análise, usando o procedimento univariado do software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc. 2003). Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (animais WT e KO), com um animal por unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste T de Student. Nas tabelas e gráficos, os valores estão representados como média \pm erro padrão da média e se considerou o nível de significância como $P < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Observação dos ciclos estrais

A Figura 9 exibe a proporção de cada uma das quatro fases do ciclo estral em ambos os grupos experimentais, além da proporção entre fase folicular, que corresponde a proestro e estro, e fase lútea, que corresponde a metaestro e diestro. Os resultados obtidos mostraram que o número de ciclos, a proporção das quatro fases absolutas do ciclo, bem como as fases folicular e lútea foram semelhantes entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Ambos apresentaram uma média de três ciclos completos no período observado (Tabela 1). Em relação à proporção das fases, a fase mais duradoura durante o período de análise foi o metaestro, seguida pelo estro. Embora o grupo nocaute tenha apresentado um período de diestro numericamente maior que o grupo selvagem, tal diferença não atingiu o nível de significância estatística.

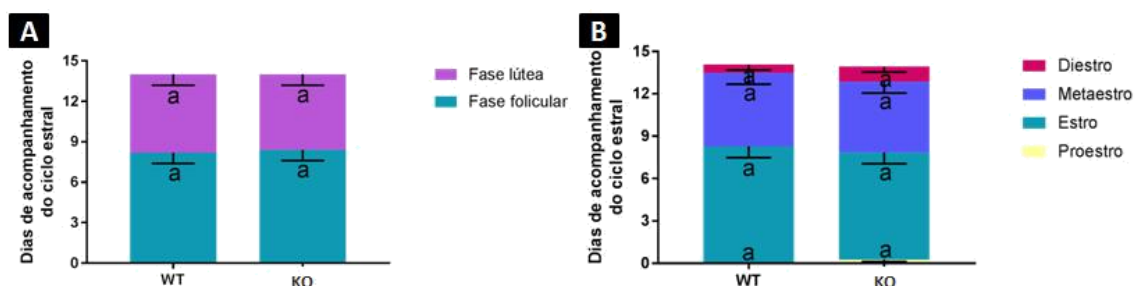


Figura 9: Proporção das fases do ciclo estral de fêmeas WT e KO

Duração das fases do ciclo estral em fêmeas WT (n=6) e KO (n=6) para o gene *Rasgf1b*, após acompanhamento dos ciclos durante 15 dias por meio de lavados vaginais. A) Representação das fases do ciclo estral: lútea e folicular. B) Representação detalhada das diferentes fases do ciclo estral: lútea (metaestro e diestro), folicular (proestro e estro). A deleção do gene *Rasgf1b* não afetou a duração do ciclo estral ($P>0,05$). ^a médias com mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística.

O ciclo reprodutivo de fêmeas mamíferas é altamente regulado por hormônios do eixo hipofisário-pituitário-gonadal (Wang & Dey, 2006; Croy et al., 2014), e diversas condições podem alterar a regulação do ciclo, como administração de fármacos, exposição à cafeína ou indução de stress crônico, dentre outros (Taylor et al., 2010; Mérici, 2017; Casillas et al., 2021). Animais nocaute para fatores envolvidos na regulação de hormônios atuantes na fertilidade apresentaram distúrbios no ciclo estral, como o fator de crescimento $TGF\beta 1$, cuja deficiência levou a extensão do ciclo estral e queda na ovulação (Ingman et al., 2006).

O fator *RasGEF1b* foi identificado em corpos lúteos de fêmeas bovinas, estando expresso durante o metaestro (formação do corpo lúteo) e ausência de expressão durante a regressão do corpo lúteo, sugerindo a participação do fator na proliferação da glândula e na regulação da síntese da progesterona (Lee & Lee, 2020). Entretanto, não havendo relatos na literatura acerca da interação entre *RasGEFs* e hormônios gonadotrópicos em murinos, nossos resultados demonstram não haver consequências da deficiência do fator *RasGEF1b* sobre esses aspectos da fertilidade feminina.

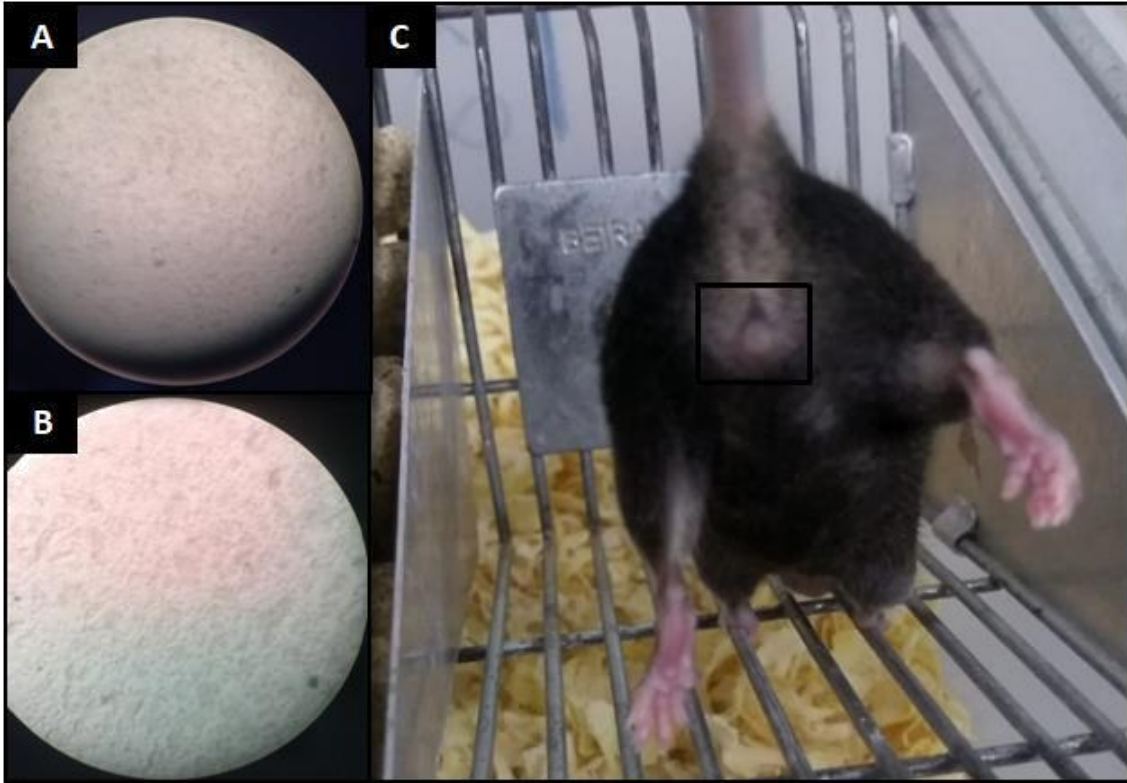


Figura 10: Lavados vaginais e plugue vaginal

Fotografias de A: estro e B: transição diestro-proestro, vistas em microscópio; e C: camundongo-fêmea após acasalamento, apresentando plugue vaginal, evidenciado pelo quadrado preto

6.2. Parâmetros reprodutivos

Os parâmetros reprodutivos de acasalamentos e ninhadas, demonstrados na Tabela 1, constituem o ponto crítico deste estudo, uma vez que ele foi elaborado a partir da observação da dificuldade de fêmeas RasGEF1b-cKO de engravidarem, e da pequena quantidade de filhotes em suas ninhadas. De fato, a parte mais demorada desse trabalho de mestrado envolveu o fechamento do n amostral do grupo KO, já que várias tentativas de acasalamento foram necessárias para que aquelas fêmeas engravidassem. A partir da constatação do plugue vaginal acompanhava-se o aumento gradual de peso para confirmação da gravidez. Algumas fêmeas nocaute chegavam a apresentar aumento de peso nos primeiros dias, porém sofrendo drástica redução de peso e retornando ao peso inicial inexplicavelmente. Apesar das colocações acima, a média de tentativas de acasalamento não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$); mesmo sendo numericamente maior em fêmeas nocaute, essa média não atingiu a significância estatística.

Em relação às ninhadas, entretanto, os grupos apresentaram diferenças marcantes entre si ($P < 0,05$), tendo o grupo WT uma média de 5.3 fetos por ninhada e pelo menos uma

reabsorção, ao passo que o grupo KO apresentou média de 1.3 fetos/ninhada e reabsorção em apenas uma das fêmeas.

Tabela 1: Parâmetros reprodutivos de fêmeas WT e KO

Parâmetros	Grupos		Probabilidade
	WT (n=6)	KO (n=6)	
Nº ciclos estrais	3,2 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	NS
Nº acasalamentos	2,0 ± 0,9 ^a	4,6 ± 0,8 ^a	NS
Nº fetos	5,3 ± 0,6 ^a	1,3 ± 0,5 ^b	< 0,001
Nº reabsorções	2,2 ± 0,3 ^a	0,1 ± 0,3 ^b	< 0,001

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística
NS: Não significativo

A diminuição do tamanho de ninhada em fêmeas RasGEF1b-cKO pode estar relacionada a problemas em diversos pontos do ciclo reprodutivo. Considerando que os cruzamentos foram homocigóticos (macho nocaute X fêmea nocaute), distúrbios na fertilidade masculina não são descartáveis. Entretanto, nosso foco está na fertilidade feminina, na qual os principais eventos são ovulação, fecundação, implantação e decidualização. A ovulação adequada depende do pico de LH no proestro e de folículos bem desenvolvidos que sejam viáveis para a fecundação adequada. Considerando nossos dados acerca do ciclo estral e das tentativas de acasalamento, não cremos haver algum distúrbio hormonal afetando esses processos. Entretanto, a foliculogênese e o desenvolvimento embrionário inicial (pré-implantação) depende de fatores do crescimento e da regulação das vias de proliferação celular, vias as quais são iniciadas por proteínas ativadas por RasGEFs (Fan et al., 2012; Wendy et al., 2006; Sargent et al., 2015).

Outro processo reprodutivo que poderia explicar a diminuição do tamanho da ninhada seria a implantação mal-sucedida. A implantação envolve vias de adesão celular, das quais RasGEFs e RasGTPases participam, e nocautes para vários genes apresentam problemas na implantação e decidualização, levando à morte fetal e a menos filhotes na ninhada, como no estudo de Pan et al. (2022). Entretanto, as fêmeas RasGEF1b-cKO também quase não apresentaram mumificações, que são perdas fetais pós-implantação, decorrentes de fatores ambientais ou da lotação intrauterina, dentre outras causas (Bolon et al., 2014). Portanto, se

nossos animais nocautes apresentam menores ninhadas por ineficiência na implantação, esse problema se manifesta no início desse processo, não havendo formação de mumificações. Ainda sobre mumificações, a presença de pelo menos uma em todas as fêmeas WT, que também possuem maiores ninhadas, indica que essas fêmeas possuem alta taxa de ovulação e de fecundações bem-sucedidas, o que representa mais um indicativo para a investigação ovariana desses animais, uma vez que constatada a presença de fetos em ambos os grupos experimentais, sabe-se que há sucesso na implantação.

Finalmente, há ainda o fato de que animais nocaute possuem um desempenho reprodutiva inferior ao de seus WT correspondentes, como testado por Byers et al. (2006) e por Vasudevan et al. (2009), com alterações no tamanho da ninhada e na qualidade de gametas e embriões.

6.3. Biometria de fetos e placentas

Apesar de ninhadas WT e KO possuírem número de fetos diferentes, em ambos os grupos os fetos eram viáveis, estavam vivos e possuíam peso corporal, cerebral e hepático, e comprimento semelhantes ($p > 0,05$), como mostra a tabela 2, o que indica que seu desenvolvimento foi adequado.

Tabela 2: Biometria de fetos proveniente de fêmeas WT e KO

Parâmetros	Grupos		Probabilidade
	WT (n=32)	KO (n=9)	
Comprimento (mm)	20,64 ± 0,3 ^a	20,14 ± 0,6 ^a	NS
Peso corporal (g)	0,96 ± 0,03 ^a	0,94 ± 0,07 ^a	NS
Peso cérebro (g)	0,073 ± 0,004 ^a	0,077 ± 0,01 ^a	NS
Peso fígado (g)	0,05 ± 0,003 ^a	0,057 ± 0,006 ^a	NS
Relação PC/PF	1,54 ± 0,1 ^a	1,55 ± 0,2 ^a	NS

NS: Não significativo

Já as placentas apresentaram diferenças interessantes entre os grupos. Placentas das fêmeas KO são mais pesadas que as placentas de fêmeas WT, menores em diâmetro e também menos eficientes ($p < 0,05$), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Biometria de placentas de fêmeas WT e KO

Parâmetros	Grupos		Probabilidade
	WT (n=32)	KO (n=8)	
Peso (g)	0,139 ± 0,005 ^a	0,188 ± 0,01 ^b	< 0,0001
Diâmetro médio (mm)	8,44 ± 0,3 ^a	6,15 ± 0,6 ^b	< 0,01
Eficiência placentária	6,98 ± 0,3 ^a	5,21 ± 0,5 ^b	< 0,001

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística

Relacionando-se as biometrias fetais e placentárias, começamos a ter um panorama do desenvolvimento desses animais. A placenta nocaute é mais pesada, porém menos eficiente e menor. Placentas mais pesadas apresentam eficiência menor, uma vez que indicam que é necessário maior aporte placentário para o desenvolvimento adequado do feto.

A eficiência placentária (EP) é definida pela razão entre peso fetal e peso placentário (PF/PP). Quanto maior a eficiência placentária, menor a placenta precisa ser para garantir o crescimento do feto, o que é um indicativo de aporte sanguíneo eficiente. Baixa eficiência placentárias está relacionada a crescimento fetal restrito e à maiores taxas de morte fetal (Longtine et al., 2011; Wilson et al., 1998).

O desenvolvimento fetal é dependente da eficiência do aporte sanguíneo placentário. Distúrbios em seu crescimento podem ser identificados pelo peso menor e pela relação entre o peso cerebral (PC) e o peso hepático (PF). Os valores de PC/PF foram semelhantes entre fetos WT e RasGEF1b-cKO, o que indica que o crescimento adequado para a idade gestacional em ambos os grupos experimentais.

Somado aos dados apresentados, há a observação de que as poucas fêmeas nocautes que possuíam a partir de três fetos por ninhada apresentavam fetos com pesos e comprimentos menores. Portanto, pode-se sugerir que o desenvolvimento fetal adequado observado em fêmeas RasGEF1b-cKO é decorrente da falta de competição por nutrientes no ambiente intrauterino, também uma das causas de crescimento fetal restrito (Souza et al., 2012). Por outro lado, o fato de o grupo KO possuir baixa eficiência placentária, e os fetos em menor quantidade possuírem parâmetros biométricos semelhantes aos muitos fetos WT, cujas placentas são mais eficientes, sugere que, proporcionalmente, os fetos KO sejam menores. Tal observação se deve

em função da ausência de competição entre demais fetos, sendo todos os nutrientes direcionados a um ou dois fetos. Assim sendo, eles deveriam ser maiores. Como não o são, os dados da biometria de fetos suportam a baixa eficiência placentária, fator que poderia ser prejudicial ao feto caso sua demanda energética aumente.

6.4. Análises histomorfométricas placentárias

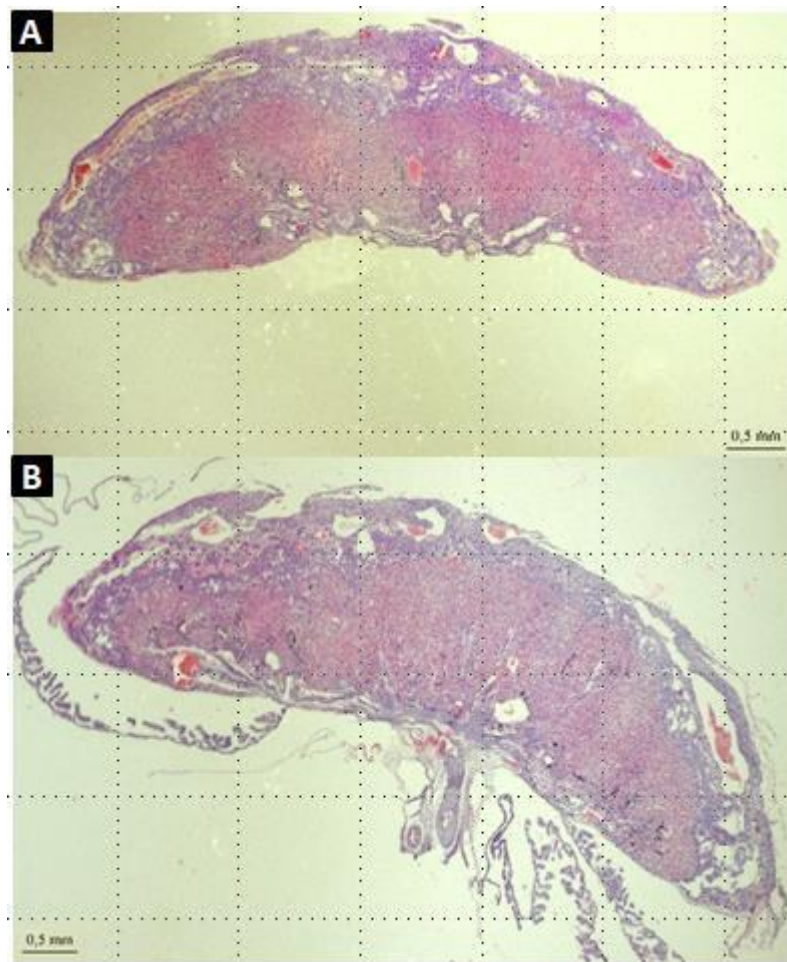


Figura 11: Fotomicrografias de placentas WT e KO

Fotomicrografias de placentas inteira em corte transversal, vista em aumento de 1,65 vezes. Pode-se distinguir as camadas placentárias. Em (A) temos uma placenta provinda de fêmea selvagem (WT), e em uma placenta provinda de fêmea RasGEF1b-cKO (KO). Não é possível identificar nenhuma diferença morfológica ou histológica entre as duas nesse aumento

As diferentes regiões histologicamente relevantes da placenta foram mensuradas quanto à sua área, com resultados apresentados na Tabela 4. Todas as três regiões apresentaram área semelhante em ambos os grupos experimentais ($P > 0,05$). Entretanto, as proporções

volumétricas de Labirintotrofoblasto e Zona Juncional indicaram maior proporção de vasos fetais e vasos maternos em placentas RasGEF1b-cKO, respectivamente ($P < 0,05$), como indicado na Tabela 5.

Tabela 4: Área das camadas placentárias de fêmeas WT e KO

Área (mm ²)	Grupos		Probabilidade
	WT (n=5)	KO (n=5)	
Placa coriônica	0,766 ± 0,08 ^a	0,968 ± 0,08 ^a	NS
Labirintotrofoblasto	3,82 ± 0,3 ^a	4,4 ± 0,3 ^a	NS
Zona Juncional	2,32 ± 0,1 ^a	2,08 ± 0,1 ^a	NS

NS: Não significativo

Tabela 5: Proporção volumétrica de Labirintotrofoblasto e Zona Juncional de fêmeas WT e KO

Região	Proporção (%)	Grupos		Probabilidade
		WT (n=5)	KO (n=5)	
Labirintotrofoblasto	Membrana interheme	58,6 ± 3,8 ^a	56,6 ± 3,8 ^a	NS
	Espaço materno	34,2 ± 3,3 ^a	28,4 ± 3,3 ^a	NS
	Vaso fetal	7,0 ± 2,4 ^a	15,2 ± 2,4 ^b	0,04
	Espongiotrofoblasto	0,06 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	NS
Zona Juncional	Espongiotrofoblasto	83,2 ± 1,9 ^a	80,6 ± 1,9 ^a	NS
	CTG-P	5,52 ± 1,3 ^a	2,82 ± 1,3 ^a	NS
	Vaso materno	11,2 ± 1,5 ^a	16,6 ± 1,5 ^b	0,03

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística

NS: Não significativo

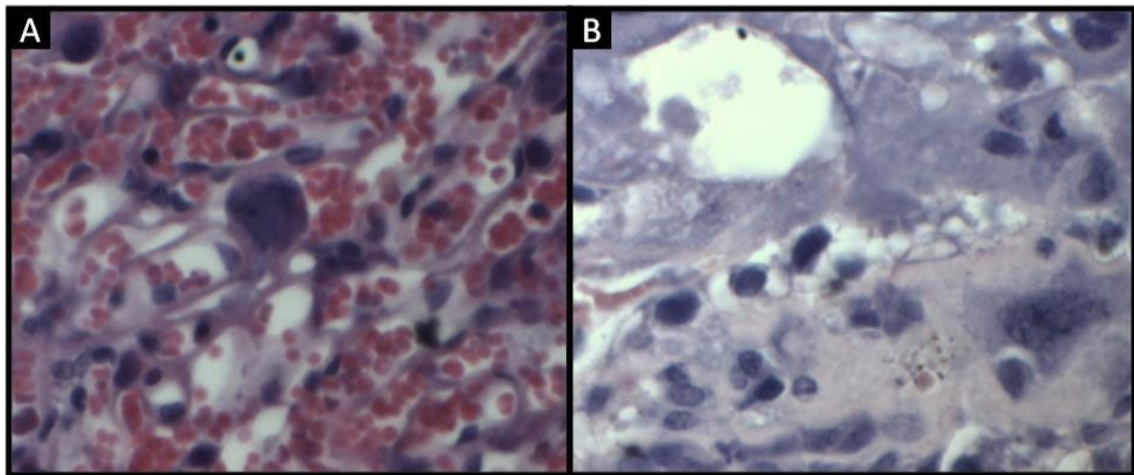


Figura 12: Fotomicrografias de labirintotrofoblasto e zona juncional

Fotomicrografias aumentadas de regiões diferentes da placenta. A: Labirintotrofoblasto, a interface materno-fetal, e B: Zona Juncional, com espongiotrofoblasto e vasos maternos atravessando

Ademais, placentas nocaute possuem membrana interheme mais espessa e vasos fetais maiores em relação a placentas WT ($p < 0,05$), como pode se ver na Tabela 6.

Tabela 6: Espessura interheme e área de vasos fetais de fêmeas WT e KO

Parâmetros	Grupos		Probabilidade	
	WT (n=5)	KO (n=5)		
Espessura membrana interheme (μm)	$2,69 \pm 0,06^a$	$2,94 \pm 0,06^b$	0,02	
Área vaso fetal (μm^2)	$209,4 \pm 23,3^a$	$286,2 \pm 23,3^b$	0,04	
Quantidade de vasos de acordo com as diferentes áreas (μm^2)	50 – 100	$2,0 \pm 0,4^a$	$1,0 \pm 0,4^a$	NS
	101 – 200	$8,0 \pm 1,1^a$	$7,4 \pm 1,1^a$	NS
	201 – 300	$5,2 \pm 1,0^a$	$3,6 \pm 1,0^a$	NS
	301 – 500	$2,2 \pm 0,6^a$	$3,0 \pm 0,6^a$	NS
	501 – 1000	$0,4 \pm 0,6^a$	$1,6 \pm 0,6^a$	NS

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística
NS: Não significativo

A proporção de células do espongiotrofoblasto, produtoras de glicogênio, não foi alterada em animais RasGEF1b-cKO, o que inicialmente é um bom indicativo, uma vez que

são reservas energéticas usadas em contexto de alta demanda, não suficientemente atendida pelo aporte sanguíneo (Tunster et al., 2020). Uma possibilidade de aprofundar as investigações nessas células seria corar secções de placenta com PAS, que marca glicogênio, para análises de conteúdo dessas reservas, como realizadas pelo grupo acima citado.

A espessura da membrana interheme é determinante na eficiência da troca materno-fetal, e se adequa para atender às demandas energéticas do feto ao longo da gestação (Coan et al., 2005; Montenegro & Filho, 2015). A maior espessura na membrana interheme da placenta nocaute é um dado que se relaciona intimamente com a maior proporção de vasos maternos presentes na Zona Juncional e na maior proporção e área de vasos fetais no Labirinto. Há uma grande remodelação vascular ocorrendo na placenta RasGEF1b-cKO, a fim de compensar a dificuldade de trocas materno-fetais com a criação de maiores áreas de contato entre o sangue materno e a circulação fetal. Assim, pode-se inferir que o maior peso em placentas nocautes vem da maior quantidade de sangue dentro do órgão, uma vez que as áreas das regiões são similares e a proporção da membrana interheme não é alterada nesses animais.

O estudo de Rennie et al. (2012) demonstrou redução na espessura da membrana interheme em camundongos C57BL/6 em diferentes dias de gestação. Tendo esse dado em mente, a espessura da membrana ser maior no grupo KO pode indicar que a placenta desses animais é imatura se comparada às dos animais WT. Isso poderia influenciar não só apenas o aporte sanguíneo adequado à demanda energética dessa fase, como levar ao nascimento tardio desses animais, uma vez que o desenvolvimento aparenta estar lento, além do aumento das chances desses filhotes nascerem com retardo no crescimento fetal.

O remodelamento vascular é importante para atender a demandas energéticas e ocorre em contextos adversos não só na placenta, mas em outros órgãos, como no fígado, e no organismo como um todo, como no fenômeno “brain-sparing effect”, em fetos acometidos por RIUC (Cohen et al., 2015; Molina-Giraldo et al., 2019). Na placenta, alterações morfológicas ocorrem no decorrer natural da gestação ou em resposta às necessidades estruturais para garantir o desenvolvimento adequado do feto (Osol & Mandala, 2009). Contudo, considerando que a eficiência placentária é baixa, e os poucos fetos possuem peso e comprimento similares aos vários fetos WT, sendo proporcionalmente menores, é possível que esse remodelamento vascular não seja suficiente para atender às demandas energéticas desse feto em estágios mais avançados do desenvolvimento, prejudicando assim seu crescimento.

Os dados encontrados sobre a morfologia placentária nos fornecem um panorama interessante do estado desse órgão no dia gestacional 17,5, no limiar da gestação pré-termo. É importante considerar que o desenvolvimento da placenta é dinâmico, e outras mudanças estruturais ocorrerão em dias posteriores, o que sugere a relevância de um estudo cinético, com mais datas, a fim de se acompanhar o desenvolvimento dessa placenta nos diferentes estágios da gravidez, desde sua formação até sua estrutura no termo (Croy et al., 2014).

Adicionalmente, alguns aspectos da estrutura placentária e de parâmetros reprodutivos não possuem mecanismos claramente explicados e/ou relacionados à ausência do fator RasGEF1b. Sabendo-se que os animais nocaute foram obtidos por meio da técnica Cre-LoxP, e que a recombinase é sabidamente capaz de agir independentemente, sendo ponto sensível de estudos com animais transgênicos desse tipo (Brault et al., 2007; McLellan et al., 2017; Chemerinski et al., 2022), é necessário considerar se alguns dos resultados ou do contexto no qual essa placenta se forma e desenvolve seriam possíveis efeitos da ação de Cre. Se a recombinase cria um ambiente de stress intrauterino, por exemplo, isso prejudicaria o processo de implantação, diminuindo a quantidade de sítios bem-sucedidos, além da maturação da placenta, atrasando seu crescimento e conseqüentemente o desenvolvimento fetal. Tal fato precisa ser considerado.

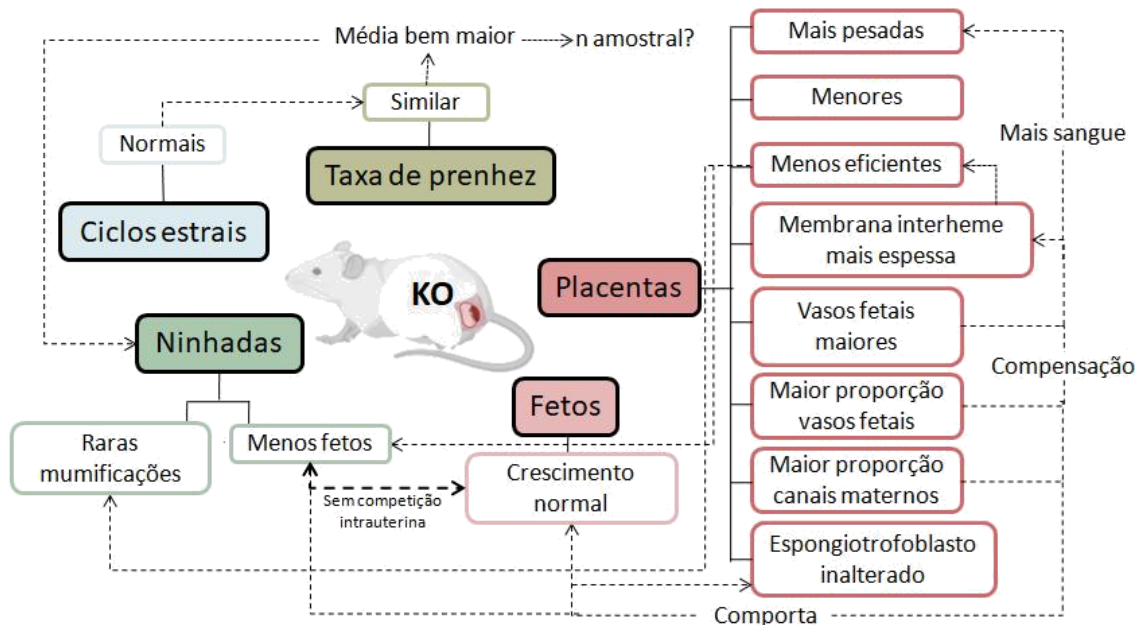


Figura 13: Esquema com os resultados encontrados Fluxograma do panorama geral da fertilidade de fêmeas murinas nocaute para o fator RasGEF1b, com dados sobre ciclo estral, ninhadas, fetos e morfologia placentária conectados.

6.5. Perspectivas

Considerando os achados inéditos do presente estudo, podemos avançar na investigação placentária, em outros aspectos da morfologia, como nas análises protocoladas por Coan et al. (2004), e também em aspectos morfofuncionais, como a angiogênese, regulada pelo fator VEGF e seus receptores, cujo sistema possuem função na vascularização placentária (Shibuya, 2013). Ademais, diante do papel que os macrófagos desempenham no estabelecimento e manutenção da gravidez normal, incluindo remodelação da artéria espiral e função angiogênica, fagocitose celular apoptótica e funções dos trofoblastos (Ning et al., 2016; Okabe et al., 2016) nos leva a interrogar se serão encontradas alterações na proporção de vasos fetais e vasos maternos do labirintotrofoblasto e zona juncional, respectivamente, nas placentas de camundongos fêmeas Rasgef1bfl/fl;LysMCre.

Os próprios macrófagos são de interesse de estudo, uma vez que são o tipo celular que mais expressa o gene, e uma imunohistoquímica que utilize um marcador específico para essas células, como o F4/80, também são de interesse. Entretanto, considerando-se que outros tipos celulares placentários também expressam o gene, utilizar marcadores específicos para o RasGEF1b ou para a proteína que ele ativa (Rap2a) seriam de muito valor para a visualização da expressão e atividade do fator na placenta.

Uma vez que este estudo avaliou placentas em estado avançado de desenvolvimento e identificou alterações em sua estrutura, possivelmente decorrentes de um ambiente intrauterino estressado, que leva a uma maturação lenta da placenta, estudar o período da janela de implantação (dia gestacional 4,5-7,5), para observar eventuais problemas na formação e desenvolvimento inicial da placenta faz-se necessário. Adicionalmente à placenta, pretendemos estudar os ovários dessas fêmeas, a fim de expandir nossa investigação sobre a fertilidade feminina nas etapas pré-implantação. Pretendemos também estudar a fertilidade masculina, por meio da contagem de espermatozoides e da caracterização morfofuncional do testículo.

Finalmente, estamos desenvolvendo uma linhagem nocaute para o fator RasGEF1b e que também não expresse a recombinase Cre como contraprova do nosso grupo controle, uma vez que a recombinase pode agir de maneira independente, como já abordado na revisão de literatura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Camundongos fêmeas deficientes do fator RasGEF1b apresentam ciclos reprodutivos com funcionamento aparentemente adequado, com as fases bem definidas e reguladas e eventos de acasalamento também dentro da média aceitável. Contudo, essas fêmeas possuem ninhadas menores e ausência de mumificações, o que nos leva a indagar o status ovariano desses animais para uma melhor compreensão desses achados.

A morfologia placentária é sensivelmente alterada pela deficiência do fator RasGEF1b, desde a sua biometria e eficiência até sua estrutura histológica, apresentando um extenso remodelamento vascular tanto dos componentes maternos quanto fetais para garantir o crescimento adequado dos poucos fetos que implantam no útero. Assim sendo, verifica-se capacidade da placenta de priorizar o desenvolvimento fetal mesmo com a estrutura alterada. Assim, sugerimos que a deficiência do fator RasGEF1b prejudica a estrutura placentária, seu desenvolvimento e sua função, comprometendo assim a capacidade uterina e o crescimento fetal, embora os mecanismos pelos quais tais alterações ocorrem ainda precisem ser mais bem elucidados.

Os achados dessa caracterização placentária, além de inéditos, fornecem novas vias de investigação da função ainda não explorada do gene Rasgef1b e de outras RasGEFs, em uma área da pesquisa de animais nocaute ainda tão ignorada.

8. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W. A., Silva, A. M., Alves, V. S., Salgado, A. P. C., Melo, M. B., Andrade, H. M., Gazzinelli, R. T. (2010). Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor. *Genes & Immunity*, 11(6), 447–457. doi:10.1038/gene.2009.107
- ARENAS-HERNANDEZ, M., Gomez-Lopez, N., Garci-Flores, V., et al. Chorionic leukocytes display a unique gene expression signature in spontaneous labor at term. *Genes Immun* 20, 56-68 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41435-017-0010-z>
- ASHKAR, A. A. et al. 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, 259-269, 2000.
- BHOJ E, Halbach S, McDonald-McGinn D, Tan C, Lande R, Waggoner D, Zackai E. Expanding the spectrum of microdeletion 4q21 syndrome: a partial phenotype with incomplete deletion of the minimal critical region and a new association with cleft palate and Pierre Robin sequence. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A(9):2327-33. doi: 10.1002/ajmg.a.36061.
- BILDIRICI I, Longtine MS, Chen B, Nelson DM. Survival by self-destruction: a role for autophagy in the placenta? *Placenta*. 2012; 33(8):591-8. doi: 10.1016/j.placenta.2012.04.011.
- BILLHAQ DH, Lee S. The Role of the Guanosine Nucleotide-Binding Protein in the Corpus Luteum. *Animals (Basel)*. 2021 May 24;11(6):1524. doi: 10.3390/ani11061524.
- BOLON, B. 2014. Pathology Analysis of the Placenta. In: Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier.175-88.
- BONNET, C., Andrieux J, Béri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, Delobel B, Copin H, Receveur A, Mathieu M, Thiriez G, Le Caignec C, David A, de Blois MC, Malan V, Philippe A, Cormier-Daire V, Colleaux L, Flori E, Dollfus H, Pelletier V, Thauvin-Robinet C, Masurel-Paulet A, Faivre L, Tardieu M, Bahi-Buisson N, Callier P, Mugneret F, Edery P, Jonveaux P, Sanlaville D. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet*. 2010 Jun;47(6):377-84. doi: 10.1136/jmg.2009.071902.
- BOS JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007 Jun 1;129(5):865-77. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.018. Erratum in: *Cell*. 2007 Jul 27;130(2):385. PMID: 17540168.
- BOUABE, H.; Okkenhaug K. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*. 2013;1064:315-36. doi: 10.1007/978-1-62703-601-6_23.
- BRANDA CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*. 2004 Jan;6(1):7-28. doi: 10.1016/s1534-5807(03)00399-x.

BRAULT V, Besson V, Magnol L, Duchon A, Hérault Y. Cre/loxP-mediated chromosome engineering of the mouse genome. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(178):29-48. doi: 10.1007/978-3-540-35109-2_2.

BROWN, S. D.; Moore MW. The International Mouse Phenotyping Consortium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mamm Genome*. 2012 Oct;23(9-10):632-40. doi: 10.1007/s00335-012-9427-x.

BURTON GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Mar 5;370(1663):20140066. doi: 10.1098/rstb.2014.0066.

BURTON, G. J., Kaufmann P;Huppertz B. Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Neill JDet al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; 2006.189-243.

BYERS SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology*. 2006 Jun;65(9):1716-26. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.016.

CAO, C., Fleming MD. The placenta: the forgotten essential organ of iron transport. *Nutr Rev*. 2016 Jul;74(7):421-31. doi: 10.1093/nutrit/nuw009.

CARVAJAL, L., Gutiérrez J, Morselli E and Leiva A (2021) Autophagy Process in Trophoblast Cells Invasion and Differentiation: Similitude and Differences With Cancer Cells. *Front. Oncol*. 11:637594. doi: 10.3389/fonc.2021.637594

CARVALHO, B. C., Oliveira LC, Rocha CD, Fernandes HB, Oliveira IM, Leão FB, Valverde TM, Rego IMG, Ghosh S, Silva AM. Both knock-down and overexpression of Rap2a small GTPase in macrophages result in impairment of NF- κ B activity and inflammatory gene expression. *Mol Immunol*. 2019 May;109:27-37. doi: 10.1016/j.molimm.2019.02.015.

CARVALHO, G. D. In vitro study of apoptosis induced in lymphocytes of BALB/c mice immunized with synthetic peptide anti-tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (SBm7462) via oral and nasal. 2008. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças; Epidemiologia e controle de qualidade de prod. de) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

CASILLAS F, Betancourt M, Juárez-Rojas L, Ducolomb Y, López A, Ávila-Quintero A, Zamora J, Ommati MM, Retana-Márquez S. Chronic Stress Detrimentally Affects In Vivo Maturation in Rat Oocytes and Oocyte Viability at All Phases of the Estrous Cycle. *Animals (Basel)*. 2021 Aug 24;11(9):2478. doi: 10.3390/ani11092478.

CETIN, I.; ALVINO, G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta*, v. 30, p. 77-82, 2009.

CHEMERINSKI, A. Liu C, Morelli SS, Babwah AV, Douglas NC. Mouse Cre drivers: tools for studying disorders of the human female neuroendocrine-reproductive axis†. *Biol Reprod*. 2022 May 17;106(5):835-853. doi: 10.1093/biolre/ioac012.

CHEN, S., Liu B, Li J, Liao S, Bi Y, Huang W, Yuan L, Yang Y, Qin A. Talin1 regulates endometrial adhesive capacity through the Ras signaling pathway. *Life Sci*. 2021 Jun 1;274:119332. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119332.

CHERFILS J, Chardin P. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 1999 Aug;24(8):306-11. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01429-2.

CHERFILS, J., ZEGHOUF, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):269-309. doi: 10.1152/physrev.00003.2012. PMID: 23303910

CIANFARANI S, Geremia C, Puglianiello A, Maiorana A, Germani D. Late effects of disturbed IGF signaling in congenital diseases. *Endocr Dev.* 2007;11:16-27. doi: 10.1159/000111054.

COAN PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod.* 2004 Jun;70(6):1806-13. doi: 10.1095/biolreprod.103.024166.

COAN, P. M. et al. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev. Dyn.* v. 235, 3280-3294, 2006.

COAN, P. M. et al. Ultrastructural changes in the interhemal membrane and junctional zone of the murine chorioallantoic placenta across gestation. *J. Anat.* v. 207, 783-796, 2005.

COHEN E, Baerts Wvan Bel F: Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist. *Neonatology* 2015;108:269-276.

COLASANTE G, Sessa A, Crispi S, Calogero R, Mansouri A, Collombat P, Broccoli V. *Arx* acts as a regional key selector gene in the ventral telencephalon mainly through its transcriptional repression activity. *Dev Biol.* 2009 Oct 1;334(1):59-71. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.07.014.

COLICELLI J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* 2004 Sep 7;2004(250):RE13. doi: 10.1126/stke.2502004re13.

COSTANZO, Linda S. *Fisiologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

COVARRUBIAS L, Nishida Y, Terao M, D'Eustachio P, Mintz B. Cellular DNA rearrangements and early developmental arrest caused by DNA insertion in transgenic mouse embryos. *Mol Cell Biol.* 1987 Jun;7(6):2243-7. doi: 10.1128/mcb.7.6.2243-2247.1987.

COYLE SM, Lim WA. Mapping the functional versatility and fragility of Ras GTPase signaling circuits through in vitro network reconstitution. *Elife.* 2016 Jan 14;5:e12435. doi: 10.7554/eLife.12435.

CROY A, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier; 2014. 808p

DANGELO JG, FATTINI CA. *Anatomia humana básica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2002. 200p.

DE MÉRICI DOMINGUES, Thaís et al. Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação em camundongos. 2017.

DE ROOIJ J, Boenink NM, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. PDZ-GEF1, a guanine nucleotide exchange factor specific for Rap1 and Rap2. *J Biol Chem*. 1999 Dec 31;274(53):38125-30. doi: 10.1074/jbc.274.53.38125.

DEY SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004 Jun;25(3):341-73. doi: 10.1210/er.2003-0020.

DÍEZ, D., Francisca Sánchez-Jiménez, Juan A. G. Ranea, Evolutionary expansion of the Ras switch regulatory module in eukaryotes, *Nucleic Acids Research*, Volume 39, Issue 13, 1 July 2011, Pages 5526–5537, <https://doi.org/10.1093/nar/gkr154>

ENGLAND-MASON G, Merrill SM, Gladish N, Moore SR, Giesbrecht GF, Letourneau N, MacIsaac JL, MacDonald AM, Kinniburgh DW, Ponsonby AL, Saffery R, Martin JW, Kobor MS, Dewey D; APrON Study Team. Prenatal exposure to phthalates and peripheral blood and buccal epithelial DNA methylation in infants: An epigenome-wide association study. *Environ Int*. 2022 May;163:107183. doi: 10.1016/j.envint.2022.107183.

EPTING D, Vorwerk S, Hageman A, Meyer D. Expression of *rasgef1b* in zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 2007 Feb;7(4):389-95. doi: 10.1016/j.modgep.2006.11.010.

ERLEBACHER, A. (2013). Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 387–411. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100003

ESTEBAN LM, Fernández-Medarde A, López E, Yienger K, Guerrero C, Ward JM, Tessarollo L, Santos E. Ras-guanine nucleotide exchange factor *sos2* is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(17):6410-3. doi: 10.1128/MCB.20.17.6410-6413.2000.

FAAS MM, de VOS P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*. 2017 Aug;56:44-52. doi: 10.1016/j.placenta.2017.03.001.

FAN HY, Liu Z, Mullany LK, Richards JS. Consequences of RAS and MAPK activation in the ovary: the good, the bad and the ugly. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jun 5;356(1-2):74-9. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.005.

FERREIRA LR, Abrantes EF, Rodrigues CV, Caetano B, Cerqueira GC, Salim AC, Reis LF, Gazzinelli RT. Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. *J Leukoc Biol*. 2002 Dec;72(6):1215-27.

FREYER, L., Lallemand Y, Dardenne P, Sommer A, Biton A, Gomez Perdiguero E. Erythromyeloid progenitor origin of Hofbauer cells in the early mouse placenta. *Development*. 2022 Apr 15;149(8): dev200104. doi: 10.1242/dev.200104

FRIOCOURT G, PARNAVELAS JG. Identification of Arx targets unveils new candidates for controlling cortical interneuron migration and differentiation. *Front Cell Neurosci*. 2011 Dec 27;5:28. doi: 10.3389/fncel.2011.00028.

GHOSH K, Van Duyne GD. Cre-loxP biochemistry. *Methods*. 2002 Nov;28(3):374-83. doi: 10.1016/s1046-2023(02)00244-x.

- GLOERICH M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol.* 2011 Oct;21(10):615-23. doi: 10.1016/j.tcb.2011.07.001.
- GONG JS, Kim GJ. The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *Clin Exp Reprod Med.* 2014 Sep;41(3):97-107. doi: 10.5653/cerm.2014.41.3.97.
- GUILLEMOT F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature.* 1994 Sep 22;371(6495):333-6. doi: 10.1038/371333a0.
- HAMBRUCH N, Haeger JD, Dilly M, Pfarrer C. EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK. *Placenta.* 2010 Jan;31(1):67-74. doi: 10.1016/j.placenta.2009.10.011.
- HEGDE S, SRIVASTAVA O. Different gene knockout/transgenic mouse models manifesting persistent fetal vasculature: Are integrins to blame for this pathological condition? *Life Sci.* 2017 Feb 15;171:30-38. doi: 10.1016/j.lfs.2016.12.019.
- HINRICHS SH, Fontes JD, Bills ND, Schneider PD. Transgenic models of human cancer. *Princess Takamatsu Symp.* 1991;22:259-74.
- HOFFMAN DJ, Powell TL, Barrett ES, Hardy DB. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev.* 2021 Jul 1;101(3):739-795. doi: 10.1152/physrev.00002.2020.
- HONG K, CHOI Y. Role of estrogen and RAS signaling in repeated implantation failure. *BMB Rep.* 2018 May;51(5):225-229. doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.5.045.
- HUA Y, Ying X, Qian Y, Liu H, Lan Y, Xie A, Zhu X. Physiological and pathological impact of AQP1 knockout in mice. *Biosci Rep.* 2019 May 14;39(5):BSR20182303. doi: 10.1042/BSR20182303.
- HUANG J, Zhou S, Ping J, Pan X, Liang G, Xu D et al. Role of p53-dependent placental apoptosis in the reproductive and developmental toxicities of caffeine in rodents. *ClinExpPharmacol Physiol.* 2012;39:357-63.
- JIANG K, Krous LC, Knowlton N, Chen Y, Frank MB, Cadwell C, Centola M, Jarvis JN. Ablation of Stat3 by siRNA alters gene expression profiles in JEG-3 cells: a systems biology approach. *Placenta.* 2009; 30(9):806-15. doi:10.1016/j.placenta.2009.06.006.
- JIANZHEN Li, Wei Ge. Zebrafish as a model for studying ovarian development: Recent advances from targeted gene knockout studies. *Molecular and Cellular Endocrinology.* Volume 507, 2020, 110778, ISSN 0303-7207, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110778>.
- KIM JY, Jun JH, Park SY, Yang SW, Bae SH, Kim GJ. Dynamic Regulation of miRNA Expression by Functionally Enhanced Placental Mesenchymal Stem Cells Promotes Hepatic Regeneration in a Rat Model with Bile Duct Ligation. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 24;20(21):5299. doi: 10.3390/ijms20215299.
- KIM, H., Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018 Dec;34(4):147-159. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147.

- KOPEĆ Z, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lipiński P. Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models. *Genes (Basel)*. 2021 Sep 2;12(9):1382. doi: 10.3390/genes12091382.
- KOS CH. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev*. 2004 Jun;62(6 Pt 1):243-6. doi: 10.1301/nr2004.jun243-246.
- KOZAK, K. R., Abbott, B. & Hankinson, O. ARNT deficient mice and placental differentiation. *Dev. Biol.* 191, 297–305 (1997).
- LEÃO FB, Vaughn LS, Bhatt D, Liao W, Maloney D, Carvalho BC, Oliveira L, Ghosh S, Silva AM. Toll-like Receptor (TLR)-induced Rasgef1b expression in macrophages is regulated by NF-κB through its proximal promoter. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020 Oct;127:105840. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105840.
- LEBEDEV. I.N., Nazarenko LP, Skryabin NA, Babushkina NP, Kashevarova AA. A de novo microtriplication at 4q21.21-q21.22 in a patient with a vascular malignant hemangioma, elongated sigmoid colon, developmental delay, and absence of speech. *Am J Med Genet A*. 2016 Aug;170(8):2089-96. doi: 10.1002/ajmg.a.37754.
- LEE SH, Lee S. Change of Ras and its guanosine triphosphatases (GTPases) during development and regression in bovine corpus luteum. *Theriogenology*. 2020 Mar 1;144:16-26. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.12.014.
- LI P, Lin Z, Liu Q, Chen S, Gao X, Guo W, Gong F, Wei J, Lin H. Enhancer RNA SLIT2 Inhibits Bone Metastasis of Breast Cancer Through Regulating P38 MAPK/c-Fos Signaling Pathway. *Front Oncol*. 2021 Oct 15;11:743840. doi: 10.3389/fonc.2021.743840.
- LIU F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2018 Jul;8(4):552-562. doi: 10.1016/j.apsb.2018.01.008.
- LIU M, Wang Y, Lu H, Wang H, Shi X, Shao X, Li YX, Zhao Y, Wang YL. miR-518b Enhances Human Trophoblast Cell Proliferation Through Targeting Rap1b and Activating Ras-MAPK Signal. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Mar 15;9:100. doi: 10.3389/fendo.2018.00100.
- LONGTINE MS, Nelson DM. Placental dysfunction and fetal programming: the importance of placental size, shape, histopathology, and molecular composition. *Semin Reprod Med*. 2011 May;29(3):187-96. doi: 10.1055/s-0031-1275515.
- LUO N, Cheng W, Zhou Y, Gu B, Zhao Z, Zhao Y. Screening Candidate Genes Regulating Placental Development from Trophoblast Transcriptome at Early Pregnancy in Dazu Black Goats (*Capra hircus*). *Animals (Basel)*. 2021 Jul 19;11(7):2132. doi: 10.3390/ani11072132.
- MAGRAM J, Bishop JM. Dominant male sterility in mice caused by insertion of a transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10327-31. doi: 10.1073/pnas.88.22.10327.
- MALUMBRES M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):459-65. doi: 10.1038/nrc1097. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):708.

- MANSOUR SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*. 1988 Nov 24;336(6197):348-52. doi: 10.1038/336348a0.
- MCLELLAN MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2017 Mar 2;7(1):1-12. doi: 10.1002/cpmo.22.
- MENG, Z., Qiu, Y., Lin, K.C. et al. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. *Nature* 560, 655–660 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0444-0>
- MITIN N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol*. 2005 Jul 26;15(14):R563-74. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.010.
- MODI, D. N. et al. Endometrial biology during trophoblast invasion. *Frontiers in Bioscience*. v. S4, 1151-1171, 2012.
- MOHAN SHRESTHA M, Wermelin S, Stener-Victorin E, Wernstedt Asterholm I, Benrick A. Adiponectin Deficiency Alters Placenta Function but Does Not Affect Fetal Growth in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 29;23(9):4939. doi: 10.3390/ijms23094939.
- MOLINA GIRALDO S, Alfonso Ayala DA, Arreaza Graterol M, Perez Olivo JL, Solano Montero AF. Three-dimensional Doppler ultrasonography for the assessment of fetal liver vascularization in fetuses with intrauterine growth restriction. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2019;144(3):260-264.
- MONTENEGRO, C. A. B.; FILHO, J. R. Rezende obstetrícia fundamental. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- MOTOMURA K, Okada N, Morita H, Hara M, Tamari M, Orimo K, Matsuda G, Imadome KI, Matsuda A, Nagamatsu T, Fujieda M, Sago H, Saito H, Matsumoto K. A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro. *PLoS One*. 2017 May 19;12(5):e0177994. doi: 10.1371/journal.pone.0177994.
- NAVABPOUR, S., Kwapis, J. L., & Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 108, 732–748. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>
- NEGISHI Y, Takahashi H, Kuwabara Y, Takeshita T. Innate immune cells in reproduction. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018; 44(11):2025-2036. 10.1111/jog.13759.
- NG WL, Marinov GK, Liao ES, Lam YL, Lim YY, Ea CK. Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway. *RNA Biol*. 2016 Sep;13(9):861-71. doi: 10.1080/15476286.2016.1207036.
- Ning F, Liu H, Lash GE. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Mar;75(3):298-309. doi: 10.1111/aji.12477. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26750089.
- OHBA Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, Kurokawa K, Mayer BJ, Maki K, Miyazaki J, Matsuda M. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for

cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J.* 2001 Jul 2;20(13):3333-41. doi: 10.1093/emboj/20.13.3333.

OKABE H, Makino S, Kato K, Matsuoka K, Seki H, Takeda S. The effect of progesterone on genes involved in preterm labor. *J Reprod Immunol.* 2014 Oct;104-105:80-91. doi: 10.1016/j.jri.2014.03.008. Epub 2014 May 10. PMID: 24933116.

OKABE Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol.* 2016 Jan;17(1):9-17. doi: 10.1038/ni.3320.

OSOL G, Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda).* 2009 Feb;24:58-71. doi: 10.1152/physiol.00033.2008.

PAN, D., Liu, Q., Du, L. et al. Polarization disorder of decidual NK cells in unexplained recurrent spontaneous abortion revealed by single-cell transcriptome analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 20, 108 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00980-9>

PANG SC, Pang JJ, Tse MY, Croy A. The Cycling and Pregnant Mouse: Gross Anatomy. In: Croy A, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy.* London: Elsevier; 2014.3-19.

PEREZ-GARCIA V, Fineberg E, Wilson R, Murray A, Mazzeo CI, Tudor C, Sienerth A, White JK, Tuck E, Ryder EJ, Gleeson D, Siragher E, Wardle-Jones H, Staudt N, Wali N, Collins J, Geyer S, Busch-Nentwich EM, Galli A, Smith JC, Robertson E, Adams DJ, Weninger WJ, Mohun T, Hemberger M. Placentation defects are highly prevalent in embryonic lethal mouse mutants. *Nature.* 2018 Mar 22;555(7697):463-468. doi: 10.1038/nature26002.

PHILIP M. Coan, Anne C. Ferguson-Smith, Graham J. Burton, *Developmental Dynamics of the Definitive Mouse Placenta Assessed by Stereology, Biology of Reproduction, Volume 70, Issue 6, 1 June 2004, Pages 1806– 1813, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024166>*

PLAISIER M et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *FertilSteril.* 2008;88:176-87.

QIAN X, Esteban L, Vass WC, Upadhyaya C, Papageorge AG, Yienger K, Ward JM, Lowy DR, Santos E. The *Sos1* and *Sos2* Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *EMBO J.* 2000 Feb 15;19(4):642-54. doi: 10.1093/emboj/19.4.642.

RANTAKARI P, Strauss L, Kiviranta R, Lagerbohm H, Paviola J, Holopainen I, Vainio S, Pakarinen P, Poutanen M. Placenta defects and embryonic lethality resulting from disruption of mouse hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 gene. *Mol Endocrinol.* 2008 Mar;22(3):665-75. doi: 10.1210/me.2007-0257.

RasGEF1b. Disponível em: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=320292>>. Acesso em 21/11/2022 Rasgef1b. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3142:1454742_at e <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS3113:131473>>. Acesso em 22/11/2022. RasGEF1b. Disponível em:

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138670-RASGEF1B/tissue/placenta>. Acesso em 22/11/2022.

REINER DJ, Lundquist EA. Small GTPases. WormBook. 2018 Aug 16;2018:1-65. doi: 10.1895/wormbook.1.67.2.

RENNIE MY, Detmar J, Whiteley KJ, Jurisicova A, Adamson SL, Sled JG. Expansion of the fetoplacental vasculature in late gestation is strain dependent in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 302(6):H1261-73. doi: 10.1152/ajpheart.00776.2011.

REYNOLDS LP, Borowicz PP, Cation JS et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol*. 2010;54:355-65.

ROJAS, J.M., Santos, E. (2006). Ras-Gefs and Ras Gaps. In: Der, C. (eds) RAS Family GTPases. Proteins and Cell Regulation, vol 4. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-4708-8_2

ROPERTO S, Russo V, Urraro C, Restucci B, Corrado F, De Falco F, Roperto F. ERas is constitutively expressed in full term placenta of pregnant cows. *Theriogenology*. 2017 Nov;103:162-168. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.047.

ROSEWEIR AK, Katz AA, Millar RP. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. *Placenta*. 2012;33(5):408-15. doi: 10.1016/j.placenta.2012.02.001.

ROSS MG, Desai M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. *Clin Obstet Gynecol*. 2013 Sep;56(3):529-36.

ROSS, M. H., Pawlina, W. *Histologia – Texto e atlas*. 2016. Guanabara Koogan; 7ª Ed.

ROSSANT J, Nagy A. Genome engineering: the new mouse genetics. *Nat Med*. 1995 Jun;1(6):592-4. doi: 10.1038/nm0695-592. PMID: 7585128.

ROSSANT, J., & CROSS, J. C. (2001). Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews Genetics*, 2(7), 538–548. doi:10.1038/35080570

SALAM RA, Das JK, Bhutta ZA. Impact of intrauterine growth restriction on long-term health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 May;17(3):249-54.

SARGENT KM, Lu N, Clopton DT, Pohlmeier WE, Brauer VM, Ferrara N, Silversides DW, Cupp AS. Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in granulosa cells using pDmrt-1-Cre or Amhr2-Cre reduces fertility by arresting follicular development and by reducing litter size in female mice. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2):e0116332. doi: 10.1371/journal.pone.0116332.

SCOTT L, WHITTINGHAM DG. Influence of genetic background and media components on the development of mouse embryos in vitro. *Mol Reprod Dev*. 1996; 43(3):336-46. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199603)43:3<336.

SHARMA D, Shastri S, Sharma P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. *Clin Med Insights Pediatr*. 2016 Jul 14;10:67-83.

SHI J, Hua L, Harmer D, Li P, Ren G. Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol Biol.* 2018;1784:263-275. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_24.

SHI W, van den Hurk JA, Alamo-Bethencourt V, Mayer W, Winkens HJ, Ropers HH, Cremers FP, Fundele R. Choroideremia gene product affects trophoblast development and vascularization in mouse extra-embryonic tissues. *Dev Biol.* 2004 Aug 1;272(1):53-65. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.04.016.

SHIBUYA M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem.* 2013 Jan;153(1):13-9. doi: 10.1093/jb/mvs136.

SIMANSHU DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell.* 2017 Jun 29;170(1):17-33. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.009.

SOUZA 2012 - Padilha, J., & Teixeira, P. (2014). Mumificação e natimortalidade fetal em suínos: uma revisão. *Nucleus Animalium*, 0.

SPEAROW JL, Barkley M. Genetic control of hormone-induced ovulation rate in mice. *Biol Reprod.* 1999;61(4):851–856.

STÄRKEL P, Charette N, Borbath I, Schneider-Merck T, De Saeger C, Abarca J, Leclercq I, Horsmans Y. Ras inhibition in hepatocarcinoma by S-trans-trans-farnesylthiosalicylic acid: association of its tumor preventive effect with cell proliferation, cell cycle events, and angiogenesis. *Mol Carcinog.* 2012 Oct;51(10):816-25. doi: 10.1002/mc.20849.

SUN C, Groom KM, Oyston C, Chamley LW, Clark AR, James JL. The placenta in fetal growth restriction: What is going wrong? *Placenta.* 2020 Jul;96:10-18. doi: 10.1016/j.placenta.2020.05.003.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* v. 127, 175-186, 2018.

TAO G, Li Z, Wen Y, Song X, Wei S, Du H, Yang Z, Xu Z, You Y. Transcription Factors Sp8 and Sp9 Regulate Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneuron Migration. *Front Mol Neurosci.* 2019 Apr 2;12:75. doi: 10.3389/fnmol.2019.00075.

TAYLOR LC, Gilmore W, Ting JP, Matsushima GK. Cuprizone induces similar demyelination in male and female C57BL/6 mice and results in disruption of the estrous cycle. *J Neurosci Res.* 2010 Feb 1;88(2):391-402. doi: 10.1002/jnr.22215. PMID: 19746424.

TELKOPARAN P, Erkek S, Yaman E, Alotaibi H, Bayık D, Tazebay UH. Coiled-coil domain containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis. *PLoS One.* 2013 Jul 19;8(7):e69289. doi: 10.1371/journal.pone.0069289.

THOMAS, J. R., Appios A, Zhao X, Dutkiewicz R, Donde M, Lee CYC, Naidu P, Lee C, Cerveira J, Liu B, Ginhoux F, Burton G, Hamilton RS, Moffett A, Sharkey A, McGovern N. Phenotypic and functional characterization of first-trimester human placental macrophages, Hofbauer cells. *J Exp Med.* 2021 Jan 4;218(1):e20200891. doi: 10.1084/jem.20200891.

TUNSTER SJ, Watson ED, Fowden AL, Burton GJ. Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. *Reproduction*. 2020 Jun;159(6):R213-R235. doi: 10.1530/REP-20-0007.

UNEK G, Ozmen A, Isenlik BS, Korgun ET. The proliferation mechanism of normal and pathological human placentas. *Histol Histopathol*. 2017 Apr;32(4):339-349. doi: 10.14670/HH-11-832.

UTOMO AR, Nikitin AY, Lee WH. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol*. 1999 Nov;17(11):1091-6. doi: 10.1038/15073.

VAN DAM TJ, Rehmann H, Bos JL, Snel B. Phylogeny of the CDC25 homology domain reveals rapid differentiation of Ras pathways between early animals and fungi. *Cell Signal*. 2009 Nov;21(11):1579-85. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.06.004. Epub 2009 Jun 28. PMID: 19567266.

VAN DAM TJ, Zwartkruis FJ, Bos JL, Snel B. Evolution of the TOR pathway. *J Mol Evol*. 2011 Oct;73(3-4):209-20. doi: 10.1007/s00239-011-9469-9. Epub 2011 Nov 5. PMID: 22057117; PMCID: PMC3236823.

VANDERLEY, C.S.B.S.; SANTANA, I.C.G. *Histologia e Embriologia Animal Comparada*. 2ª Edição. Fortaleza: Editora UECE, 2015.

VASUDEVAN K, Raber J, Szein J. Fertility comparison between wild type and transgenic mice by in vitro fertilization. *Transgenic Res*. 2010 Aug;19(4):587-94. doi: 10.1007/s11248-009-9336-2.

VIGIL, D., Cherfils, J., Rossman, K. et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. *Nat Rev Cancer* 10, 842–857 (2010).
<https://doi.org/10.1038/nrc2960>

WANG DZ, Hammond VE, Abud HE, Bertoncetto I, McAvoy JW, Bowtell DD. Mutation in *Sos1* dominantly enhances a weak allele of the EGFR, demonstrating a requirement for *Sos1* in EGFR signaling and development. *Genes Dev*. 1997 Feb 1;11(3):309-20. doi: 10.1101/gad.11.3.309.

WANG X. Cre transgenic mouse lines. *Methods Mol Biol*. 2009;561:265-73. doi: 10.1007/978-1-60327-019-9_17.

WANG YN, Ye Y, Zhou D, Guo ZW, Xiong Z, Gong XX, Jiang SW, Chen H. The Role of Syncytin in Placental Angiogenesis and Fetal Growth. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10:852561. doi: 10.3389/fcell.2022.852561.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation clues from mouse models. *Nature*. v. 7, 185-199, 2006.

WENDY V. Ingman, Rebecca L. Robker, Karen Woittiez, Sarah A. Robertson, Null Mutation in Transforming Growth Factor β 1 Disrupts Ovarian Function and Causes Oocyte Incompetence and Early Embryo Arrest, *Endocrinology*, Volume 147, Issue 2, 1 February 2006, Pages 835–845, <https://doi.org/10.1210/en.2005-1189>

WENNERBERG K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005 Mar 1;118(Pt 5):843-6. doi: 10.1242/jcs.01660. PMID: 15731001.

WILSON, M.E., Wilson, M.E., Biensen, N.J., Youngs, C.R., Ford, S.P. 1998. Development of meishan and Yorkshire littermate conceptuses in either a meishan or Yorkshire uterine environment to day 90 of gestation and to term. *Biology of Reproduction*;58(4):905-910.

YANG L, Lin W, Nugent CA, Hao S, Song H, Liu T, Zheng P. Lingguizhugan Decoction Protects against High-Fat-Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Alleviating Oxidative Stress and Activating Cholesterol Secretion. *Int J Genomics.* 2017;2017:2790864. doi: 10.1155/2017/2790864.

YANG W, Klaman LD, Chen B, Araki T, Harada H, Thomas SM, George EL, Neel BG. An Shp2/SFK/Ras/Erk signaling pathway controls trophoblast stem cell survival. *Dev Cell.* 2006 Mar;10(3):317-27. doi: 10.1016/j.devcel.2006.01.002.

ZHANG J, Liu X, Gao Y. The long noncoding RNA MEG3 regulates Ras-MAPK pathway through RASA1 in trophoblast and is associated with unexplained recurrent spontaneous abortion. *Mol Med.* 2021 Jul 8;27(1):70. doi: 10.1186/s10020-021-00337-9.

ZHAO Y, Lykov N, Tzeng C. Talin-1 interaction network in cellular mechanotransduction (Review). *Int J Mol Med.* 2022 May;49(5):60. doi:10.3892/ijmm.2022.5116.

ZHAO Y, Lykov N, Tzeng C. Talin-1 interaction network in cellular mechanotransduction (Review). *Int J Mol Med.* 2022 May;49(5):60. doi:10.3892/ijmm.2022.5116.

ZHAO, X., Jiang, Y., Jiang, T. et al. Physiological and pathological regulation of autophagy in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 302, 293–303 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05607-1>.

9. ANEXO I

**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 187/2021**Título do projeto:** Avaliação de parâmetros reprodutivos e caracterização morfofuncional de placenta de camundongos nocaute (RasGEF1b-KO)**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Morfologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 13/09/2021. Validade: 13/09/2021 à 12/09/2026.
Belo Horizonte, 13/09/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br