

THAÍS DE MÉRICI DOMINGUES E PAULA

**Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal
decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação em
camundongos**

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Dr. Hélio Chiarini Garcia

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2017

THAÍS DE MÉRICI DOMINGUES E PAULA

Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação em camundongos

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

Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Dr. Hélio Chiarini Garcia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2017

“O Senhor é o meu Pastor; Nada me faltará.”
Salmo 23.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade, por sempre guiarem meus caminhos, nos bons e maus momentos.

Aos meus pais, Rosaura e Geraldo, pela dedicação integral, amor, carinho, preocupação, e por se doarem inteiramente para que eu pudesse conquistar tudo o que já consegui. Vocês são meu porto seguro sempre.

Ao meu companheiro Felipe Shang, por seu carinho, amor, dedicação, compreensão e cumplicidade nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos e familiares de Sete Lagoas, de Belo Horizonte, de Igarapé e de outros cantos do Brasil, pelos dias leves e pelo sorriso fácil. Às minhas novas amigas de Alvo, Alê, Isabela e Anna, por me deixarem mais perto de Deus com nossas reuniões tão produtivas e abençoadas. Às meninas da República Café com Leite, que são foram ótimas companheiras nas horas boas e ruins.

Aos meus “papitos do laboratório”, Marcos de Lucca e Fabíola Nihi, ou melhor, Nizão e Culino: vocês não só me inspiraram e ajudaram ao longo de todo este mestrado, mas também me proporcionaram ótimos momentos felizes ao seu lado.

À professora Fernanda Almeida, por ter me aceitado com tanto carinho como sua orientanda, me permitindo realizar este projeto e me auxiliando em todos os momentos, obrigada pela sua confiança e dedicação.

Ao professor Hélio Chiarini, por ter aberto as portas do laboratório desde a primeira troca de e-mails, pelos ensinamentos e grande auxílio na execução dos experimentos.

Aos amigos queridos do LABER, que levarei com carinho por toda a vida, pela ajuda nos dias úteis e nos sábados domingos e feriados também. Pelo apoio e participação neste trabalho, que com certeza não seria o mesmo sem a ajuda de vocês.

Aos professores de outros laboratórios, que também me ajudaram a realizar este projeto, dentre eles Patrícia Martinelli e Enrrico Bloise; e aos alunos Grazi, Carlos, Gabriel e Lílian, que, apesar de serem de outros laboratórios, sempre estiveram prontos para me ajudar em qualquer momento de necessidade.

A todos os colegas, professores e funcionários do ICB, mais especificamente do Departamento de Morfologia.

Às meninas da limpeza, que passam despercebidas pelos corredores do ICB, mas cuidam com muito zelo deste patrimônio. Em especial à Neli, que sempre deixa nosso biotério limpo e organizado, um brinco.

Não menos importante, aos animais devo grande respeito e admiração pela existência e aprendizado adquirido através deles.

Enfim, agradeço a todos que estiveram comigo e me auxiliaram tanto durante este período, seja com um simples sorriso de “você consegue”, seja com aprendizado e cumplicidade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	05
LISTA DE FIGURAS	06
LISTA DE TABELAS	07
RESUMO	08
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO	10
OBJETIVOS	12
1. Objetivo geral	12
2. Objetivos específicos	12
REVISÃO DE LITERATURA	13
1. Cafeína: ação e metabolismo	13
2. Sistema genital feminino e gestação	15
3. Ciclo reprodutivo em fêmeas de roedores.....	17
4. A placenta	18
5. Humanos e roedores: uma comparação entre modelos experimentais	21
6. Efeitos da cafeína nos embriões/fetos	23
MATERIAL E MÉTODOS	29
1. Comitê de ética	29
2. Animais e grupos experimentais	29
3. Tratamento pré-gestacional	30
4. Tratamento gestacional	30
5. Eutanásia e coleta de material biológico	31
6. Biometria	32
7. Processamento e análise das placentas para avaliações morfológicas e morfométricas.....	32
7.1 Área das regiões placentárias	32
7.2 Medida de vasos sanguíneos.....	33
7.2.1 Proporção volumétrica de grandes vasos placentários	33
7.2.2 Proporção de vasos fetais e maternos	34
8. Análises estatísticas.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
1. Características fenotípicas e parâmetros reprodutivos	35
2. Consumo de ração e ganho de peso corporal	38
3. Dados biométricos obtidos no terço médio da gestação (11,5 DG)	41
4. Dados biométricos obtidos no terço final da gestação (17,5 DG)	42
5. Dados histomorfométricos da placenta.....	44
5.1 Proporção entre áreas placentárias	44
5.2 Proporção de grandes vasos do labirinto	45
5.3 Tipos de vasos do labirinto	45

6. Outras observações morfológicas	48
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	61
Anexo 1: Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais	61
Anexo 2: Publicação do artigo de revisão proveniente deste trabalho	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AE – aborto espontâneo

BPN – baixo peso ao nascer

CC – grupo controle

CIUR – crescimento intrauterino restrito

CTG-C – células trofoblásticas gigantes de canal

CTG-P – células trofoblásticas gigantes parietais

CTG-S – células trofoblásticas gigantes sinusoidais

EP – eficiência placentária

ERC – Estudo randomizado controlado

DG – dias gestacionais

D60 – grupo tratado com doses de 60 mg/kg de cafeína

D120 – grupo tratado com doses de 120 mg/kg de cafeína

D240 – grupo tratado com doses de 240 mg/kg de cafeína

FDA – *Food and Drug Administration*

uNK – células *natural killer* uterinas

VEGF –fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo da cafeína	13
Figura 2: Fotografias representando útero em fêmeas de camundongo	16
Figura 3: Desenho esquemático mostrando a disposição das áreas placentárias comparativamente entre as placentas de camundongos e humanos	19
Figura 4: Fotomicrografia de corte transversal de placenta de camundongo.....	21
Figura 5: Fotografia mostrando a presença de plugue vaginal (seta) em fêmea após a cobertura	31
Figura 6: Fotomicrografia mostrando a seleção das áreas placentárias de interesse	33
Figura 7: Fotomicrografia demonstrando a delimitação de grandes vasos sanguíneos presentes no labirinto placentário	34
Figura 8: Fotomicrografia de placenta com graticula sobreposta	35
Figura 9: Fotografia de fêmea do grupo tratado com dose máxima de cafeína	36
Figura 10: Fotografia de útero gravídico pertencente a fêmea do grupo experimental D240.....	38
Figura 11: Ganho de peso dos animais durante a gestação nos três grupos experimentais	41
Figura 12: Fotomicrografia representando as diferenças entre sangue fetal, com hemácias globosas e nucleadas, e sangue materno, com hemácias já maduras	46
Figura 13: Proporção de vasos sanguíneos maternos e fetais e componentes do labirinto nos diferentes grupos experimentais	47
Figura 14: Fotomicrografias comparativas de placentas no terço final de gestação (D17,5)	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características reprodutivas das fêmeas dos grupos experimentais controle (CC) e tratados com doses baixa (D60), moderada (D120) e alta (D240) de cafeína aos dias 11,5 (terço médio) e 17,5 (terço final) de gestação	37
Tabela 2- ganho de peso gestacional total e consumo de ração ao longo dos tratamentos	39
Tabela 3- Parâmetros biométricos, fetais e placentários no terço médio gestacional (D11,5) nos grupos experimentais controle e tratados com doses baixa e moderada de cafeína	41
Tabela 4- Parâmetros biométricos, fetais e placentários no terço final gestacional (D17,5) nos grupos experimentais controle e tratados com doses baixa e moderada de cafeína	43
Tabela 5- Dados histomorfométricos das placentas no terço final da gestação (D17,5) nos grupos experimentais	45

RESUMO

A cafeína é uma substância consumida comumente por gestantes e está presente em alimentos como café, chás, refrigerantes, chocolates, alguns medicamentos, dentre outros. Devido à sua capacidade de atravessar a membrana placentária e se acumular no organismo do feto, a cafeína e seus metabólitos têm sido contraindicados ou sugeridos em doses mínimas durante a gestação, embora ainda não haja um consenso sobre a dosagem de segurança. Estudos em humanos e roedores relacionam o consumo de cafeína a menores índices de fertilização, de implantação embrionária, alterações na estrutura placentária, aumento da ocorrência de baixo peso fetal e placentário, abortos e natimortos. Devido à escassez de estudos caracterizando as alterações histomorfométricas na estrutura e vascularização placentárias, o objetivo deste projeto foi avaliar as alterações biométricas e morfológicas decorrentes do consumo diário de cafeína administrada em diferentes dosagens durante estágios gestacionais distintos. Para tanto, camundongos Swiss fêmeas foram submetidas à ingestão diária de cafeína em doses variadas antes e durante o período gestacional, enquanto o grupo controle foi submetido à gavagem contendo somente água. Nos dias 11,5 e 17,5 de gestação, as fêmeas prenhes foram eutanasiadas para coleta de material biológico, que posteriormente foi submetido a análises biométricas e histomorfométricas. Os resultados encontrados mostraram provável efeito antifertilidade da cafeína, uma vez que as fêmeas tratadas apresentaram diestros mais prolongados e menor taxa de prenhez. Além disso, filhotes de animais tratados apresentaram-se mais leves que os demais, bem como suas placentas e eficiência placentária. Não houve alteração no tamanho das áreas placentárias, embora uma menor irrigação por vasos maternos em detrimento de um aumento de vasos fetais tenha sido observada em doses moderadas de cafeína. Achados neste assunto auxiliarão na elucidação das alterações placentárias e fetais decorrentes ao consumo de cafeína durante a gestação.

Palavras chave: cafeína, placenta, desenvolvimento placentário, morfometria, biometria.

ABSTRACT

Caffeine is a substance commonly consumed by pregnant women, and is present in foods such as coffee, tea, soft drinks, chocolate and some medications. Due to its ability to cross the placental membrane and accumulate in the fetal body, caffeine and its metabolites have been contraindicated or suggested at minimal doses during gestation. Although there is still no consensus on the safety dosage, studies in humans and rodents experimental models link caffeine consumption with lower rates of fertilization, embryo implantation, changes in placental structure, low fetal and placental weights, abortions and stillborn. Due to the lack of studies characterizing the histomorphometrical changes in placental structure and vascularization, the objective of the study was to evaluate biometric and morphological changes caused by daily caffeine consumption administered at different dosages during different gestation stages. Female Swiss mice were subjected, by gavage, to daily caffeine intake through low, moderate and high varied doses, while the control group received water, before and during the gestational period. On days 11.5 and 17.5 of gestation, pregnant female mice were euthanized for biological material collection, which was then submitted to biometric and histomorphometric analysis. The results showed a likely infertility effect of caffeine, since treated females had longer diestrus hours and a lower pregnancy rate. In addition, treated offspring were lighter than other as well as their placentas and placental efficiency. There was no change in placental areas size, although less irrigation by maternal vessels in detriment of an increase in fetal vessels was observed in moderate doses of caffeine. The findings of this project may help the elucidation of placental and fetal changes due to caffeine consumption during gestation.

Keywords: Caffeine, placenta, placental development, morphometric, and biometrics.

INTRODUÇÃO

A cafeína é uma substância estimulante do grupo das xantinas, consumida em todo o mundo sob a forma não apenas de café, mas também de algumas variedades de chá, como o chá mate, o chá verde e o chá branco. Refrigerantes de guaraná e cola, alimentos à base de cacau, bebidas energéticas e alguns medicamentos também perfazem a lista de alimentos que possuem cafeína como constituinte. Estima-se que 90% das mulheres entre 18 e 24 anos consumam alimentos cafeinados, em uma média de 166 mg de cafeína/dia (Frary et al, 2005). Com o objetivo de combater a sonolência e/ou fadiga, ou simplesmente como um hábito previamente existente, o consumo durante a gestação também é comum, especialmente a partir do segundo trimestre gestacional (Dews, 2011; Butt & Sultan, 2011; Grosso & Bracken, 2005). Devido a alterações fisiológicas na degradação da cafeína, diferentes doses são recomendadas ao longo do tempo de gestação (EFSA, 2015; Grosso & Bracken, 2005). Por exemplo, em mulheres não grávidas, recomenda-se um consumo máximo de 400 mg de cafeína diários, enquanto que em gestantes a recomendação de ingestão varia de 100 a 300 mg, sendo a quantidade recomendada inversamente proporcional ao período gestacional (Partosch et al, 2015; Ree et al, 2015; Momoi et al, 2008; FDA, 2002). Estudos epidemiológicos revelaram que grávidas consomem menos cafeína que as demais mulheres, variando entre 120 e 300 mg por dia. Tal consumo médio diário foi estimado em 1,5 a 4,6 xícaras de 100 mL, doses estas consideradas não seguras para gestantes, de acordo com quantidades previamente preconizadas (Barone & Roberts, 1996).

No entanto, há grande dificuldade em quantificar a ingestão de cafeína, uma vez que o teor desta substância pode variar de acordo com o tipo de grão e de cultivo do café, bem como as formas de preparação e a espécie das plantas contendo cafeína (Burke et al, 2013; Arnaud, 1987). A degradação da cafeína também varia conforme as características metabólicas individuais, os fatores genéticos e o uso concomitante de outras substâncias como tabaco e álcool (Burke et al, 2013). Por exemplo: uma xícara de 150 mL de café pode conter, em média, 100 a 150 mg de cafeína variando de acordo com a espécie

do grão, o tipo de torra e o método de preparo da bebida. Por outro lado, 150 mL de café solúvel podem conter até 27 mg de cafeína, enquanto a mesma quantidade de café fervido pode conter até 111 mg (Momoi et al, 2008; Barone & Roberts, 1996; Arnaud, 1993). Em outras fontes, o teor de cafeína também é variável: o chá pode apresentar uma média de 32 a 42 mg/150 mL, enquanto em bebidas à base de cola, pode-se observar um teor entre 32 a 70 mg/330 mL e 4 mg/150 mL em alimentos como o cacau (Barone & Roberts, 1996; Arnaud, 1987; Bowes, 1989).

Diante do exposto, sabe-se que a cafeína, ao atravessar livremente a placenta, pode prejudicar o desenvolvimento fetal, não somente promovendo alterações biométricas, mas também teciduais e na vascularização placentária. Entretanto, ainda são incipientes os estudos acerca das alterações histomorfométricas e moleculares decorrentes do consumo elevado de cafeína durante a gestação.

Dessa forma, nossa proposta consistiu na utilização de placentas e fetos de camundongos Swiss como modelos experimentais para se investigar os efeitos deletérios do consumo crônico da cafeína durante a gestação. Este modelo animal é muito utilizado para estudos mais invasivos, caracterizando-se por um maior controle pré-coleta e confiabilidade dos dados obtidos (Burton et al, 2006; Croy et al, 2014). As doses foram estabelecidas e classificadas de acordo com fatores de conversão que equivaleriam a doses baixas, moderadas e elevadas em seres humanos: convertendo-se estas doses em xícaras de 100 mL de café, elas equivalem a: baixa: 1,5 xícara/dia; moderada: 3 xícaras/dia; e alta: 6 xícaras/dia (Huang et al., 2012).

Achados neste assunto certamente poderão auxiliar na elucidação das alterações placentárias, especialmente morfométricas, decorrentes do consumo de cafeína durante o período gestacional de camundongos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do consumo diário de cafeína durante a gestação sobre a morfologia placentária e biometrias fetal e placentária.

2. Objetivos específicos

Comparando os efeitos de diferentes dosagens de cafeína durante as idades gestacionais de 11,5 e 17,5 dias, os objetivos específicos foram:

- Avaliar alterações reprodutivas tais como duração do ciclo estral, taxa de prenhez, e número de embriões/fetos viáveis ;
- Avaliar dados biométricos, tais como peso corporal das fêmeas prenhes, peso placentário, peso e tamanho dos fetos e de alguns órgãos fetais (fígado e cérebro);
- Avaliar, por meio de análises histomorfométricas, alterações na placenta, especificamente na zona juncional, no labirinto e na placa coriônica.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cafeína: ação e metabolismo

A cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) é uma substância alcaloide cuja meia-vida, em humanos, pode variar de duas a 4,5 horas, podendo alcançar, inclusive, 12 horas. Uma vez ingerida, sua absorção pelo trato gastrointestinal estará completa em 45 minutos, com pico de concentração plasmática entre 15 e 120 minutos após a ingestão (Nehlig, 1999). Ela é quase totalmente metabolizada por enzimas hepáticas – especialmente a citocromo-oxigenase P450 - a dimetilxantinas. Dentre as principais dimetilxantinas originadas, encontram-se a paraxantina, a teobromina e a teofilina (Figura 1) (Grosso & Bracken, 2005).

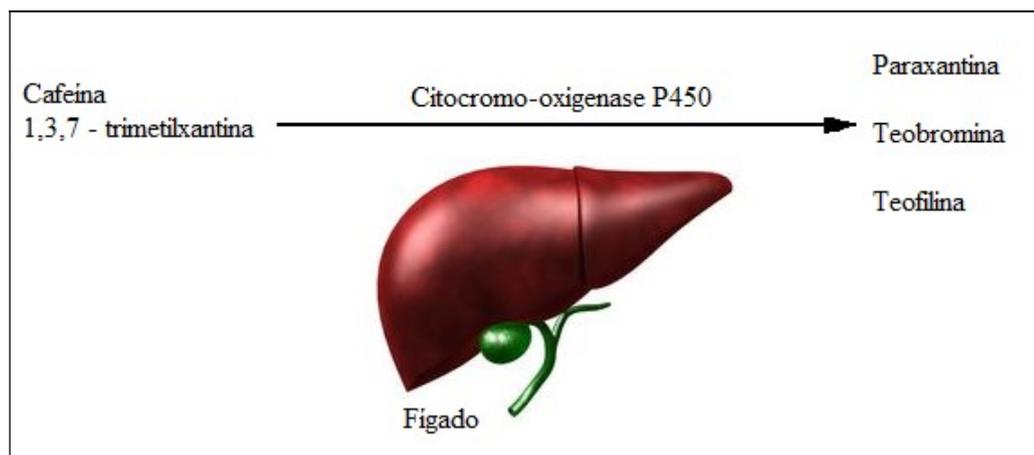


Figura 1: metabolismo da cafeína

A paraxantina, metabólito primário, corresponde a 72% a 80% do metabolismo final da cafeína em humanos e em roedores (Grosso & Bracken, 2005; Klebanoff, 1998). Paraxantina é considerada um antagonista de adenosina, uma vez que é capaz de se ligar aos receptores A1 de adenosina do sistema nervoso central e periférico. A adenosina, via sinalização celular, controla os estímulos excitatórios, promove a redução de atividade motora e da frequência cardíaca, aumenta a sensação de sono e reduz a liberação de neurotransmissores e hormônios. Uma vez impedida de se ligar aos seus receptores pela

ação antagônica da paraxantina, a adenosina e seus efeitos metabólicos são diminuídos, enquanto há um aumento de neurotransmissores na circulação (Grosso & Bracken, 2005; Harland, 2000). Esta é a razão pela qual a cafeína é usualmente consumida como estimulante: para aumentar a vigília, reduzir a sonolência e a fadiga (Burke et al, 2013).

A teobromina, responsável por efeitos farmacológicos como o aumento da diurese, estimulação do sistema cardiovascular, relaxamento da musculatura lisa e aumento da secreção glandular, perfaz em torno de 10% dos produtos de degradação da cafeína (Arnaud, 1993). Já a teofilina perfaz em torno de 5% dos produtos de degradação e apresenta estrutura química semelhante à da cafeína, porém com meia-vida superior (3 a 9 horas ou mais) (Grosso & Bracken, 2005).

Tanto a cafeína quanto os seus metabólitos são moléculas muito pequenas altamente lipofílicas. Sendo assim, possuem extrema facilidade de se difundir através dos tecidos por difusão passiva, atravessando, inclusive, membranas biológicas de alta seletividade e baixa permeabilidade, como a hematotesticular, a hematoencefálica e a placentária. (Mose et al, 2008; Christian & Brent, 2001).

Durante a gestação, devido ao aumento de estrogênio circulante, ocorre uma redução da atividade das enzimas P450 citocromo-oxigenases, e conseqüente redução na metabolização (*clearance*) e na excreção de cafeína, teofilina e paraxantina. Isso leva à deposição destas substâncias nos tecidos maternos e fetais, dada a sua facilidade de difusão através da placenta (Yadegari et al, 2016; Jahanfar & Jaafar, 2015; Sesardic et al, 1990). Com o avançar da gestação, ocorre redução da atividade enzimática proporcional à idade gestacional, acarretando um aumento da meia-vida destes metabólitos de até 18 horas em tecidos maternos e fetais durante o último trimestre gestacional (Tsutsumi et al, 2001). Tsutsumi et al (2001) reportaram uma progressiva redução na atividade de CYP1A2 ao longo do primeiro, segundo e terceiro trimestres gestacionais. Neste estudo, todas as participantes mantiveram a sua ingestão habitual de cafeína antes e durante a gravidez, e ainda assim a sua degradação foi drasticamente reduzida ao longo do período gestacional. Uma vez que fetos e recém-nascidos são incapazes de metabolizar estas substâncias, sua eliminação fica totalmente dependente de um sistema

renal ainda em desenvolvimento (Klebanoff et al, 2002).

Em humanos, estudos envolvendo o consumo de cafeína e sua associação com efeitos adversos no desenvolvimento fetal mostraram resultados conflitantes devido à dificuldade de acesso a material biológico e aferição adequada da quantidade real de cafeína nos alimentos ingeridos pelas gestantes (Grosso & Bracken, 2005; Bracken et al, 2002; Bowes, 1989). Além disso, as principais fontes de informação sobre o consumo materno desta substância são dados epidemiológicos e relatos de estudos longitudinais de consumo reportados pelas pacientes em anamneses de cuidado pré-natal. Uma metanálise recente da Cochrane Library (2015) revisou sistematicamente todos os estudos publicados relacionando mulheres grávidas, consumo de cafeína e efeitos adversos. Após a exclusão da maior parte dos estudos devido a inconsistências metodológicas, foi concluído que as evidências com humanos são insuficientes para estabelecer a presença de efeitos adversos na gestação pelo consumo materno de cafeína, uma vez que estudos randomizados controlados (ERC) sobre o assunto são escassos. Adicionalmente, por razões éticas, estudos do tipo são contraindicados. Até o momento, roedores, como ratos e camundongos, são os modelos mais bem adaptados para este tipo de estudo, uma vez que seu tecido placentário e metabolismo de cafeína são similares aos de humanos (Dews, 2011; Burton et al, 2006; Arnaud, 1993; Rossant & Cross, 2001).

2. Sistema Genital Feminino e gestação

O sistema genital feminino é composto por órgãos responsáveis pela reprodução, sendo também apto a abrigar um novo ser durante todo o seu desenvolvimento embrionário e fetal. Em mamíferos, é composto por órgãos genitais externos (vulva, clitoris e vestíbulo vaginal) e internos (Dangelo e Fattini, 2002). Alguns órgãos internos merecem destaque devido à sua participação direta na concepção, fertilização e gestação. São eles:

- Gônadas (ovários): estruturas pares responsáveis pela produção de ovócitos a partir da foliculogênese e também de hormônios esteroides (estrógeno e progesterona). Estes hormônios,

estrógeno e progesterona, são necessários para o desenvolvimento dos caracteres secundários femininos e atuam sobre o útero, favorecendo a implantação e o desenvolvimento embrionário inicial, respectivamente. Uma vez ovulados, os ovócitos são captados pelas fimbrias das tubas uterinas e transportados até o útero (Dangelo e Fattini, 2002).

- Tubas uterinas: constituem tubos pares estreitos e sinuosos, responsáveis pela captação dos oócitos liberados durante a na ovulação. Além disso, é o local onde ocorre a fertilização e inicia o processo de clivagem (Dangelo e Fattini, 2002).

- Útero: trata-se do órgão onde ocorre a implantação do embrião e o desenvolvimento fetal até o nascimento. Seu formato varia entre as espécies, sendo de “pera invertida” em mulheres e bicórneo (em formato de “Y”) em roedores (Figura 2 A, B). Morfologicamente, apresenta três camadas: endométrio (camada mais interna), miométrio (camada muscular média) e perimétrio (reveste externamente o órgão), sendo que o endométrio participa ativamente do processo de implantação embrionária e placentação (Pang et al, 2014;).

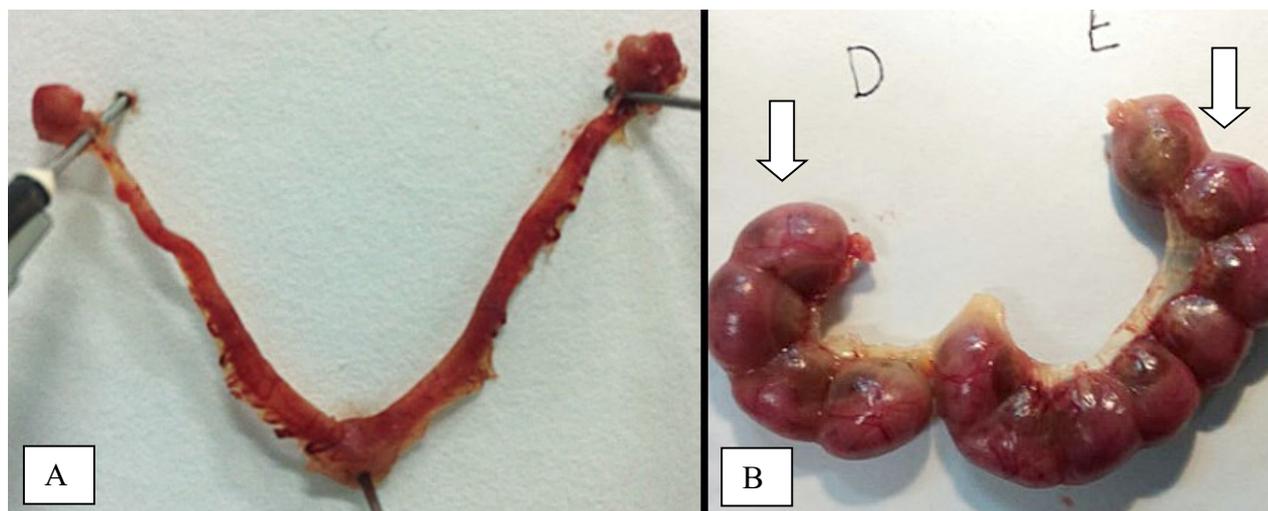


Figura 2: Fotografias representando útero em fêmeas de camundongo. A: Útero em formato de “Y” em fêmea nulípara; B: útero de fêmea no terço final de gestação (DG 17,5), apresentando fetos, conforme sinalizado pelas setas.

- Vagina: é o órgão de cópula feminino, caracterizado por um tubo de paredes parcialmente

colabadas que se comunica superiormente com o útero, formando o canal do parto. Em roedores, o sêmen aí depositado durante a ejaculação sofre coagulação, formando um tampão ou plugue vaginal temporário que é utilizado como um sinal de ocorrência de cópula. (Pang et al, 2014).

3. Ciclo reprodutivo em fêmeas de roedores

As fêmeas de roedores apresentam ciclo estral caracterizado por quatro fases: *proestro*, *estro*, *metaestro* e *diestro*, sendo que cada fase apresenta duração média de um dia. Brevemente, no proestro as fêmeas apresentam um pico de estrógeno e um rápido crescimento folicular que antecederá o estro, fase ovulatória caracterizada pelo período em que a fêmea aceita o macho para cópula. Na ausência de concepção, o estro é sucedido durante um curto período pelo metaestro, quando se observa aumento progressivo na concentração de progesterona até o período de diestro, caracterizado pela formação do corpo lúteo e baixos níveis de estrógeno (Croy et al, 2014).

Caso o ovócito liberado durante o estro seja fertilizado, o embrião formado sofrerá várias divisões mitóticas ainda no interior da tuba uterina, até o estágio de mórula, já dentro dos cornos uterinos. Neste local, o embrião evolui para o estágio de blastocisto, apresentando duas populações celulares distintas: a massa celular interna e o trofoblasto (camada externa) (Florman e Ducibella, 2006). A implantação do embrião ocorre em função da interação entre o útero materno (endométrio) e o blastocisto, permitindo o desenvolvimento fetal subsequente. Dessa forma, a implantação possibilitará a interação vascular entre as interfaces materna e fetal e posterior formação da placenta, que terá início no oitavo dia de gestação em camundongos. O período gestacional total em camundongos varia de 18 a 21 dias (Florman e Ducibella, 2006). Aos 11,5 DG de camundongos, temos placentas completamente formadas, mas ainda com tamanho reduzido; já aos 17,5 DG, podemos encontrar placentas em seu estágio máximo de desenvolvimento e tamanho (Crow et al., 2014). Em humanos, a gestação média dura de 37 a 41 semanas, e temos uma placenta já funcional na 12^a semana gestacional (Moore, 2013).

4. A placenta

A placenta é a interface de troca entre mãe e feto, sendo responsável pelo transporte de nutrientes, gases e substratos energéticos que permitem o desenvolvimento adequado dos mamíferos eutérios. Em 1937, Mossman definiu a placenta como “uma aposição ou fusão entre membranas fetais e mucosa uterina para trocas fisiológicas”. Considerando que a placenta tem como objetivo nutrir o feto, estas formas de nutrição variam consideravelmente entre as espécies. Os tipos placentários também variam de acordo com a estrutura microscópica, as características vasculares, o formato macroscópico, o tipo de interdigitação feto-placentária, o arranjo vascular e o tipo de barreira materno-fetal formada (Burton et al, 2006).

Tanto em humanos quanto em roedores, a placenta é do tipo discoidal, pois apresenta formato discoide, sendo a interação materno-fetal restrita a esta área circular em comum denominada cotilédone (Burton et al, 2006). Roedores apresentam um único cotilédone por feto, enquanto humanos possuem um grupo de cotilédones formando sua estrutura discoide. (Burton et al, 2006). Do ponto de vista desta interação, as placentas de primatas e roedores caracterizam-se tipicamente por uma invasão dos tecidos maternos pelos vasos fetais, sendo o trofoblasto (camada externa do blastocisto) diretamente banhado pelo sangue da mãe. A este tipo de barreira materno-fetal em íntimo contato, dá-se o nome de placentação hemocorial (Burton et al, 2006). Comparando-se os números de camadas placentárias, as placentas de roedores são tricoriais, com três regiões distintas de células trofoblásticas, enquanto as humanas possuem apenas duas (Quadro 1; Figura 3).

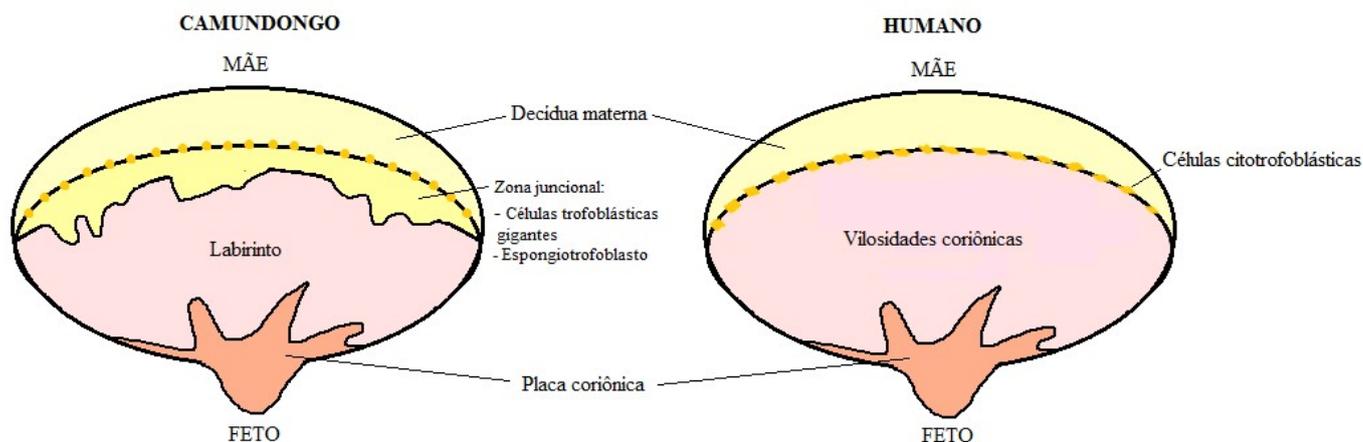


Figura 3: Desenho esquemático mostrando a disposição das áreas placentárias comparativamente entre as placentas de camundongos e humanos

Quadro 1: Estudo comparativo das principais estruturas morfológicas presentes em placentas de humanos e camundongos (Adaptado de Rossant & Cross, 2001)

Camundongo	Humano	Localização da estrutura	Função geral
Células trofoblásticas gigantes	Células citotrofoblásticas	Componente da camada mais externa da placenta	Mediar a implantação e invasão uterina
Espongiofoblasto	Não possui	Camada estrutural externa da placenta do roedor; Ausente em seres humanos	Função desconhecida
Labirinto	Vilosidades coriônicas	Camada interna da placenta, recoberta por sinciciotrofoblasto	Troca direta entre sangue fetal e materno

Morfologicamente, a formação da placenta (humana e de roedores) inicia-se no momento em que ocorre a implantação do blastocisto no endométrio uterino. Células do trofoblasto fetal inserem-se no endométrio e se diferenciam em dois subtipos de tecidos: o sinciciotrofoblasto, formado por células multinucleadas em contato com os tecidos maternos, envolvendo o conceito pré-formado; e o citotrofoblasto, composto por células uninucleadas originalmente formadas na parede do blastocisto, em rápida divisão celular. O crescimento de cito e sinciciotrofoblasto levam à invasão dos tecidos maternos, seguindo-se a formação de vacúolos que coalescem em lacunas dentro do sinciciotrofoblasto. Quando a implantação é dita completa: o feto está totalmente incorporado à parede uterina, e recoberto pelo

epitélio endometrial (Crow et al, 2014; Burton et al, 2006). Em camundongos, entre os dias 10,5 e 11,5 de gestação, tem-se uma estrutura placentária definitiva (Burton et al, 2006).

A estrutura placentária de camundongos é histologicamente dividida em três regiões distintas, que se iniciam a partir da decídua materna: zona juncional, labirinto e placa coriônica. Mais distal ao feto, a decídua materna ou basal é composta por células endometriais modificadas com núcleos basofílicos pálidos, citoplasma eosinofílico e bordas celulares indistintas. Estas células servem como fagócitos durante o remodelamento placentário e também secretam fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Células *natural killer* uterinas (uNK) também compõem a decídua, e são responsáveis por função imunológica e angiogênica (Croy et al, 2014). Na decídua, encontramos também os vasos maternos sob a forma de artérias espiraladas e seios venosos, que formam uma rede vascular. Esta rede vascular está inserida na placenta sob a forma de um canal envolvido por células trofoblásticas gigantes de canal (CTG-C) e atravessa todo o tecido em direção ao labirinto.

O primeiro compartimento fetal inferior à decídua é estreito e avascular, denominado zona juncional. Ele é composto por células trofoblásticas gigantes parietais (CTG-P) e espongiotrofoblasto. As células gigantes parietais são grandes e possuem núcleo bem destacado e basofílico, rodeado por um abundante citoplasma eosinofílico. Já o espongiotrofoblasto é um tecido rico em depósitos de glicogênio e inúmeras células ovais pequenas com núcleos basofílicos e citoplasma escasso. Entre a placa coriônica e a zona juncional, observa-se o labirinto, formado por células de origem tanto materna, quanto embrionária. Esta região é composta por uma rica rede de capilares fetais banhados por sangue materno oriundos das artérias espiraladas maternas que adentraram a zona juncional. É no labirinto que ocorrem as trocas efetivas de nutrientes, gases e metabólitos materno-fetais. Estes canais fetais, que são caracterizados pela ausência de tecido endotelial, são envolvidos e separados do sangue materno por uma barreira celular composta de células trofoblásticas gigantes mononucleadas denominadas sinusoidais (CTG-S). Durante o desenvolvimento fetal, pode-se diferenciar hemácias não-nucleadas maternas espalhadas por espaços denominados sinusoides e grandes hemácias fetais, nucleadas, dentro

dos canais. A porção placentária final é formada pela placa coriônica, composta por grandes vasos sanguíneos que penetram esta placa e são conectados aos vasos do cordão umbilical (Croy et al, 2014).

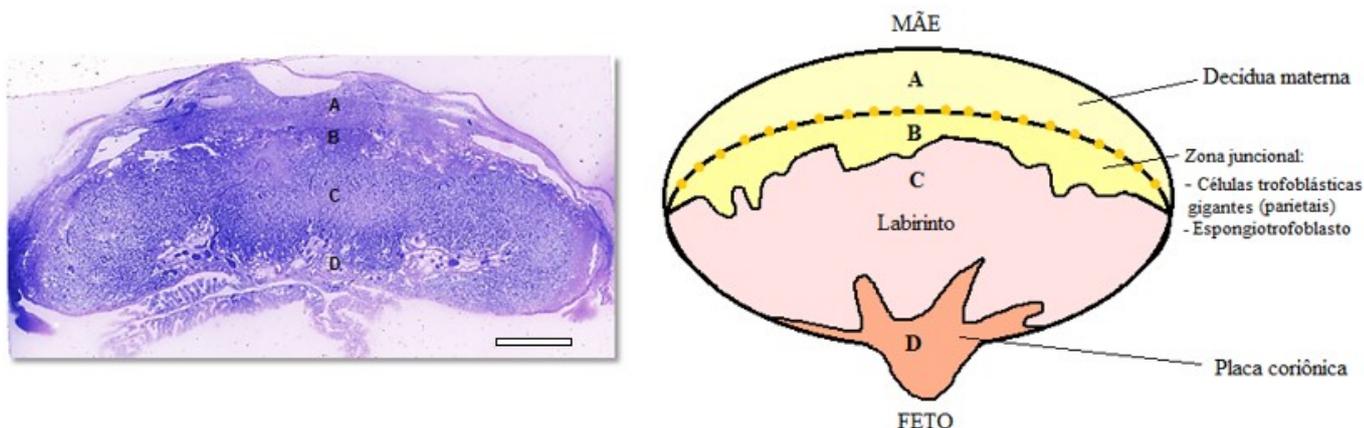


Figura 4: Fotomicrografia de corte transversal de placenta de camundongo no terço final da gestação (DG 17,5 dias gestacionais), mostrando as diferentes regionais da placenta: A decídua materna, B zona juncional, C labirinto e D placa coriônica. Os vasos da placa coriônica irão formar o cordão umbilical. Barra: 416,7 μ m

A angiogênese placentária é fundamental na manutenção da gestação (Reynolds et al, 2010). Alguns fatores de crescimento e fatores reguladores do fluxo sanguíneo participam ativamente do processo de formação dos vasos sanguíneos placentários desde a implantação até a maturação completa da placenta. Dentre eles, destaca-se o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) placentário, sintetizado pelas células trofoblásticas gigantes. Ao interagir com um de seus receptores, como o Flk1, o VEGF promove a migração celular, a proliferação de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular (Plaisier et al, 2007), o que permitirá a formação adequada dos vasos sanguíneos placentários que participarão das trocas materno-fetais durante a gestação.

5. Humanos e roedores: uma comparação entre modelos experimentais

Erros metodológicos são encontrados classicamente em todos os estudos relacionados ao

consumo humano de cafeína durante a gravidez. Estudos observacionais de coorte, bem como transversais, evidenciaram resultados variados, embora ainda não tenham conseguido mostrar qualquer associação entre a ingestão de cafeína e efeitos adversos na gestação (Jahanfar & Jaafar, 2015; Bracken et al, 2002). Além disso, ensaios clínicos controlados randomizados seriam os mais indicados, mas se revelam difíceis ou mesmo antiéticos. Por outro lado, os estudos com animais mostraram-se mais acessíveis e com resultados evidentes que poderiam ser aplicáveis a humanos, embora algumas particularidades tenham de ser consideradas (Croy et al, 2014).

A placenta é a principal interface de troca entre mãe e feto durante a gestação. Considerando que a placenta visa nutrir e controlar a passagem de várias substâncias para o feto, os estudos animais direcionados à aplicação clínica requerem um modelo placentário compatível com características humanas (Silva & Serakides, 2016). Atualmente, roedores e primatas não humanos parecem representar os melhores modelos associados à gestação e ao desenvolvimento fetal (Christian & Brent, 2001).

Tanto roedores quanto humanos apresentam o tipo placentário discoide, sendo a interação materno-fetal restrita a uma área circular comum denominada cotilédone (Burton et al, 2006). Placentas de primatas e roedores são caracterizadas por vasos fetais diretamente banhados por sangue materno (placenta hemocorial) (Reynolds et al, 2010; Burton et al, 2006). No entanto, comparando-se a barreira celular formada entre sangue materno e vasos fetais, o número de camadas placentárias de roedores (três camadas) é superior ao de humanos (duas camadas), o que confere ao roedor uma maior resistência a substâncias tais como a cafeína (Rossant & Cross, 2001). Tal resistência resulta em um fator de conversão que extrapola as doses de consumo humano em modelos de estudos de cafeína utilizando camundongos e ratos, e fatores de correção se tornam necessários para o estabelecimento de uma dose comparável entre estas espécies (Huang et al, 2012; Reagan-Shaw, 2007; Christian & Brent, 2001; Wang, 1999).

A degradação da cafeína e a formação de seus metabólitos também variam de acordo com as espécies estudadas. No entanto, investigações precoces comparando farmacocinética da cafeína em

humanos e muitas espécies de animais demonstraram algumas semelhanças (Christian & Brent, 2001). Por exemplo, a absorção de cafeína no trato gastrointestinal atinge 99% em humanos e animais aproximadamente 45 minutos após a sua ingestão (Nehig, 1999). Tanto em humanos como em roedores, a cafeína é metabolizada a três dimetilxantinas. Embora os primatas não humanos possam inicialmente ser um modelo apropriado que forneça dados valiosos para a extrapolação para seres humanos, o principal metabólito originado pós-metabolização é a teofilina. Conseqüentemente, primatas não humanos não fornecem um bom modelo experimental para avaliar os efeitos da cafeína sobre a reprodução, pois a paraxantina é o metabólito predominante na degradação em humanos e sua função e meia-vida são diferentes da teofilina (Christian & Brent, 2001).

Sendo assim, os roedores – camundongos e ratos – são considerados um bom modelo experimental para estudos em humanos com base nas semelhanças de biodegradação da cafeína (mesma meia-vida, além de possuírem a paraxantina como principal metabólito de degradação da cafeína) e estruturas placentárias similares para prováveis comparações de resultados de gestação (Bracken et al, 2002).

6. Efeitos da cafeína em embriões e fetos

A cafeína é uma pequena molécula capaz de atravessar as membranas placentárias, atingindo a circulação do feto (Dews, 2011). Como o feto é incapaz de metabolizá-la adequadamente, é exposto ao mesmo nível de cafeína ingerida pela mãe (Mose et al, 2008; Leon et al, 2002; Arnaud, 1987).

A confirmação da passagem livre da cafeína através da placenta, associada aos primeiros estudos com altas doses dessa substância em animais nos anos 60 (Nishimura & Nakai, 1960; Fujii, 1969), levou a associação *US Food and Drug Administration* (FDA) a implementar, cerca de 20 anos após estas descobertas, uma recomendação restringindo ou removendo o consumo de café por mulheres grávidas (FDA, 1980; Terada, 1975; Gilbert & Pistey, 1973; Fujii, 1969; Nishimura, 1960). Posteriormente, a mesma instituição emitiu uma carta recomendando que a ingestão máxima de cafeína por mulheres

grávidas fosse 200 mg/dia ou o equivalente a 1,5 a 2 xícaras de café de 100 mL (FDA, 2002). Também foi sugerido que a ingestão de cafeína fosse restrita a até 300 mg/dia após os estudos de quantificação em uma grande amostra de alimentos e após a realização de ensaios clínicos com adultos de ambos os sexos e animais (Butt & Sultan, 2011). Atualmente, alguns grupos de pesquisa sugerem ainda que a ingestão máxima deva ser de 100 mg/dia ou menos (Partosch et al, 2015; Wadge, 2009; Momoi et al, 2008). Entretanto, ainda não foi estabelecido um consenso quanto à ingestão máxima de cafeína durante a gestação.

Estima-se que 69 a 79% das mulheres gestantes consumam cafeína (Huang et al, 2012; Frary, 2005). Sabe-se que outras fontes de cafeína comumente consumidas, além do café, aumentam ainda mais esta estimativa e conseqüentemente a quantificação adequada, tornando difícil estabelecer um controle seguro de ingestão (Jahanfar & Jaafar, 2015).

O consumo de cafeína está associado negativamente às mudanças gestacionais nos animais, tais como taxas mais baixas de fertilização e implantação embrionária, baixos peso ao nascer e peso placentário, aumento do número de abortos, aumento da expressão de marcadores apoptóticos e alteração da formação nervosa, articular e óssea (Ma et al, 2015; Reis et al, 2015; Huang et al, 2012; Ballesteros-Yanez et al, 2012; Momoi et al, 2008).

Huang et al. (2012) relataram alterações reprodutivas em camundongos fêmeas tratadas com cafeína. Todos os animais tratados não só reduziram a taxa de concepção total, mas também tiveram um ganho de peso materno inferior durante a prenhez. Yadegari et al. (2016), utilizando doses intraperitoneais de 150 mg/kg/dia de cafeína em ratos albinos fêmeas durante os cinco primeiros dias gestacionais (DG), relataram que o grupo tratado apresentou uma diminuição significativa dos sítios de implantação, bem como do número de nascidos vivos, sugerindo que a cafeína poderia causar efeitos antifertilidade.

Elmazar et al. (1981) administraram cafeína em camundongos albinos, via intraperitoneal e oral, e descreveram o aumento da corticosterona circulante e presença de fenda palatina nas ninhadas. Silva et

al (2013), após exposição de ratas a doses orais de 0,3 g / L de cafeína (diluída em água), sugeriram que a exposição da ninhada à cafeína durante a gestação e lactação teve efeitos deletérios sobre o desenvolvimento neuronal, hipocampo hiperativado, susceptibilidade a convulsões e déficits cognitivos que poderiam permanecer mesmo na vida adulta. Serapiao-Moraes et al. (2013) relataram que a prole de camundongos gestantes C57BL/6 tratados com doses diárias de cafeína subcutânea de 20 mg/kg durante a gestação, tiveram menor ganho de peso durante o crescimento e diminuição da taxa metabólica basal. Os animais adultos também apresentaram aumento no tamanho dos cardiomiócitos e menor vascularização do tecido cardíaco.

Adicionalmente, anormalidades ósseas são descritas em fetos de mães tratadas com cafeína. Olchowik et al. (2011) relataram que a ingestão de 30 mg/dia de cafeína durante a gestação afetou negativamente o tecido ósseo em ratos. Tomaszewski et al. (2012), utilizando microsonda de raios-X para examinar fêmeas de fetos de ratos tratados com 30 mg/dia de cafeína, observaram que a diminuição da mineralização óssea era dominante no grupo tratado.

Mesmo havendo diversos estudos que investigam o nascimento e desenvolvimento da prole, estudos descrevendo alterações histomorfológicas e fisiológicas placentárias pós-exposição à cafeína ainda são escassos. Huang et al (2012), avaliando um consumo de 180 mg/kg de cafeína durante a gestação em ratos Wistar, observaram regiões edematosas no retículo endoplasmático, expansão das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, desgranulação dos ribossomas e condensação da heterocromatina em células trofoblásticas. Além disso, foi demonstrado no estudo de Ma et al (2015) um aumento da apoptose e inibição da angiogênese após exposição à cafeína. É importante notar que a maioria dos estudos com animais aponta para um provável comprometimento da formação do labirinto placentário, provavelmente causado por anormalidades circulatórias (Bolon, 2014).

Muito já foi concluído sobre o efeito da cafeína em animais, embora os mecanismos mediadores desses efeitos ainda permaneçam obscuros. Mais estudos são necessários para demonstrar as alterações estruturais causadas pela cafeína durante o desenvolvimento placentário, e se tais alterações também

podariam ocorrer em seres humanos.

Uma vez que em humanos a maior parte das informações obtidas é resultante de estudos epidemiológicos, a quantificação de cafeína ingerida tem sido feita a partir de biomarcadores sanguíneos ou urinários na tentativa de se obter um resultado mais preciso. No entanto, todos esses biomarcadores são influenciados pela meia-vida dos metabólitos e o tempo em que a amostragem foi realizada. Outros fatores como tabagismo, idade gestacional e vômitos exacerbados também influenciam os resultados (Greenwood et al, 2014; Grosso et al, 2008; Grosso & Bracken, 2005). Neste sentido, um estudo tentou estabelecer uma associação entre a quantificação de cafeína ingerida e a análise de urina materna, do sangue do cordão umbilical e do auto relato de consumo materno (Grosso et al, 2008). Os autores concluíram que os biomarcadores de soro e urina não refletem a real exposição à cafeína durante a gestação, sugerindo que o auto relato materno seria a melhor maneira de estimar o consumo diário de alimentos ricos em cafeína. Portanto, um estudo em humanos envolvendo o consumo de cafeína auto relatado durante a gestação torna-se susceptível a vários tipos de vieses, tais como: seleção, desempenho, detecção, relato e outros (Jahanfar & Jaafar, 2015).

Embora estudos utilizando roedores mostrem evidências sobre os efeitos deletérios do consumo de cafeína durante a gestação, estudos realizados em humanos envolvendo ingestão de cafeína e a gestação são inconclusivos desde 1970. Vários destes não encontraram qualquer relação entre o consumo de cafeína e anormalidades fetais: esta relação foi encontrada apenas em gestantes fumantes e/ou etilistas que consumiam altas doses de café (Olsen, 1991; Peacock et al, 1991; Linn et al, 1982). Neste sentido, Bech et al (2005) realizaram um estudo de coorte para determinar se o consumo de cafeína durante a gravidez estaria associado à morte fetal no terço final da gestação. Os resultados mostraram que o consumo materno de mais de 8 xícaras/dia de café aumentou a mortalidade fetal, especialmente após 20 semanas de gestação. No entanto, o mesmo grupo em 2007, realizou um estudo randomizado duplo-cego, comparando a duração da gestação e o peso ao nascer de 1207 mulheres grávidas que consumiram café instantâneo com cafeína ou descafeinado. Eles concluíram que uma

redução moderada no consumo de cafeína no segundo trimestre gestacional não fez efeito algum sobre as características avaliadas.

Del Castillo et al (2015), usando um estudo transversal com 1175 mulheres, investigaram se a ingestão de cafeína durante a primeira metade da gestação prejudicaria o desenvolvimento fetal. Embora tenham encontrado redução de peso no recém-nascido de mães que consumiram altas doses de cafeína, não foram encontradas relações entre a ingestão de cafeína, o baixo peso ao nascer (definido como peso ao nascer inferior a 2.500 g) e a prematuridade.

Em contraste, outros estudos sugeriram a ocorrência de efeitos nocivos pelo consumo excessivo de cafeína em mulheres durante a gestação. Alguns autores demonstraram uma maior frequência de atraso do crescimento fetal intrauterino de mães que consumiram cafeína no terceiro trimestre de gestação (Gaskins et al, 2016; Del Castillo et al, 2015; Martin & Bracken, 1987; Stein & Susser, 1991). Os abortos espontâneos e/ou as malformações fetais também estiveram associados ao consumo desta substância, embora a complexidade metodológica e a dificuldade para medir a ingestão de cafeína limitassem uma conclusão mais precisa (Browne et al, 2007; Van't, 1982). Gaskins et al (2016), utilizando um estudo prospectivo de coorte, identificaram uma tendência linear entre o consumo de mais de 400 mg de cafeína/dia (aproximadamente 4 doses de café) antes da gestação e a ocorrência de aborto espontâneo (AE) até 20 semanas de gestação em mulheres sem história de AE. Em comparação com as mulheres que não consumiram café durante o período pré-gestacional, o risco de AE aumentou em 20%. Outras bebidas cafeinadas relatadas pelos pacientes não foram associadas a este risco. Resultados semelhantes foram previamente descritos por Weng et al (2008), que observaram em seu estudo de coorte prospectivo que mulheres grávidas que ingeriram mais de 200 mg de cafeína durante a gestação aumentaram o risco de aborto em até 25%.

Modelos de perfusão *in vitro* e *ex vivo*, como células cultivadas de placenta humana, também foram explorados na tentativa de estabelecer uma dose segura de consumo de cafeína durante a gestação (Partosch et al, 2015; Grant, 2012; Poulsen et al, 2009). Em 2014, uma perfusão *ex vivo* da placenta

humana provou que a cafeína atravessa livremente o tecido por difusão passiva, conforme relatado anteriormente, independentemente da dose utilizada (Poulsen et al, 2009). Utilizando um modelo *in vitro*, Grant et al (2012) observaram que a cafeína inibe a invasão e a motilidade do trofoblasto, o que poderia levar a distúrbios na gestação, como aborto e pré-eclâmpsia. Assim, de acordo com esses autores, o consumo de cafeína na gestação deveria ser desencorajado. Além disso, Partosch et al (2015), usando um modelo cinético fisiologicamente baseado para simular a concentração de cafeína no sangue de mulheres não grávidas e grávidas, recomendou que as doses diárias de cafeína ingerida deveriam ser inferiores a 200 mg, sempre divididas em porções separadas ao longo do dia.

Muitas metanálises foram realizadas associando-se ingestão de cafeína e desfechos adversos durante a gestação. No entanto, até agora, apenas resultados inconclusivos foram encontrados. Em suas metanálises atualizadas periodicamente com ensaios clínicos randomizados em humanos, Jahanfar e Jaafar (2015; 2013; 2009) declararam que não há evidências suficientes para apoiar alterações na ingestão máxima de recomendação de cafeína pela mãe em transtornos gerais de gestação, sendo também confirmado por Greenwood e colegas (2014). Por outro lado, outras metanálises de estudos observacionais associaram o consumo de cafeína a vários resultados negativos durante a gestação. Li e cols (2015) avaliaram o consumo de café e cafeína com o aborto espontâneo e encontraram uma associação dose-dependente que apontava para um risco potencial do término gestacional precoce. Rhee et al (2015) focaram sua metanálise em estudos de coorte e de casos-controle que relacionaram o consumo dependente da dose de cafeína durante a gestação e a ocorrência de recém-nascidos de baixo peso ao nascer (baixo peso ao nascer – BPN). Os resultados mostraram que, para cada aumento de 100 mg de cafeína consumida durante a gestação, a incidência de BPN aumentou em 3%, sendo este aumento linear de acordo com a dose consumida.

Uma vez que não existem provas conclusivas o suficiente para se estabelecer uma dose segura de cafeína, a atual indicação da *FDA* ainda é utilizada na prática clínica e aplicada na maioria dos estudos que avaliam a segurança desta quantidade de cafeína durante a gravidez.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Comitê de ética

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), protocolo nº 395/2015 (Anexo 1).

2. Animais e grupos experimentais

Noventa fêmeas de camundongos Swiss adultas em idade reprodutiva (60 dias de idade) foram adquiridas junto ao Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG e mantidas na sala de experimentação animal do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG em condições padrão de claro-escuro (12h de luz: 12h de escuridão) e temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$). Após sua aquisição, as mesmas foram pesadas e mantidas durante uma semana para aclimatação.

Após o período de aclimatação, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

- Grupo controle CC (n = 20); fêmeas que receberam água por gavagem;
- Grupo D60 (dose baixa; n = 22): fêmeas que receberam 60 mg/caféina/kg/dia por gavagem;
- Grupo D120 (dose moderada; n = 24): fêmeas que receberam 120 mg/caféina/kg/dia por gavagem;
- Grupo D240 (dose alta; n = 24): fêmeas que receberam 240 mg/caféina/kg/dia por gavagem.

A caféina (Sigma-Aldrich - Reagent Plus®, C0750) administrada foi diluída em água e fornecida sempre no mesmo horário (17:00h). Estas doses equivalem, respectivamente, a 200, 300 e 500mg de caféina/dia (1,5, 3 e 6 xícaras de 100 mL) de consumo em humanos, de acordo com o fator de correção para camundongos estabelecido por Wang (2005) e posteriormente aplicado por Huang et al (2012). Durante todo o experimento, os animais receberam água e ração peletizada (Nuvilab®) *ad libitum* isentos de caféina.

O número obtido de animais baseou-se na necessidade de obtenção de cinco fêmeas prenhes por grupo experimental, por idade gestacional.

3. Tratamento pré-gestacional

Durante sete dias, cada fêmea recebeu a cafeína diluída em água por gavagem de acordo com as dosagens mencionadas previamente, num volume final de 0,55mL por animal, proporcional à capacidade de diluição total da cafeína e a um volume gástrico aceitável para estes animais. A gavagem foi feita diariamente em horários fixos, próximo ao início do período escuro dos animais. Os animais do grupo CC (controle) foram manipulados da mesma maneira descrita para os tratados D60, D120 e D240, sendo que cada fêmea recebeu 0,55 mL apenas de água, sem teor algum de cafeína.

Lavados diários para citologia vaginal foram feitos em todas as fêmeas no mesmo período do dia, a fim de se identificar a fase do ciclo estral na qual cada uma se encontrava.

4. Tratamento gestacional

No oitavo dia, duas fêmeas no proestro ou no estro foram colocadas juntas em gaiolas com um macho adulto durante o período necessário para a cobertura das mesmas. O início da gestação (dia gestacional 0,5 ou DG0,5) foi considerado como o dia onde se visualizou a presença de plugue vaginal (Figura 5) (Pang et al., 2014; Byers et al., 2012). No DG0,5, as fêmeas prenhes foram separadas das demais, sendo o procedimento de gavagem mantido juntamente com a mensuração periódica do peso corporal e consumo de ração. A quantificação do consumo ração foi obtida a partir da pesagem a cada 24h do conteúdo de ração existente nas caixas dos animais, e em seguida dividindo-se a diferença de peso pelo número de animais por caixa.

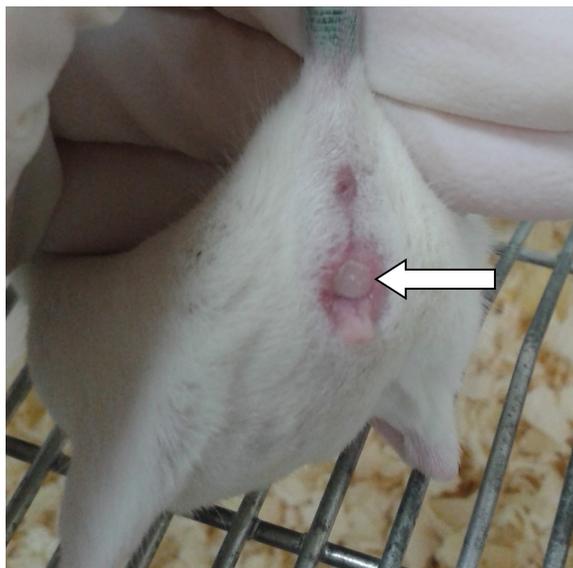


Figura 5: Fotografia mostrando a presença de plugue vaginal (seta) em fêmea após a cobertura.

5. Eutanásia e coleta de material biológico

As coletas foram feitas, para todos os grupos (CC, D60, D120 e D240), nos dias gestacionais (DG) 11,5 (terço médio da gestação; placentas em fase final de formação; $n = 39$) e DG 17,5 (terço final da gestação; tamanho máximo da placenta; $n = 36$). As idades gestacionais para a eutanásia foram previamente estabelecidas conforme desenvolvimentos placentários descritos por Crow et al (2014) e Burton et al (2006). As fêmeas de cada grupo experimental foram pesadas e posteriormente anestesiadas por meio de injeção intramuscular de uma associação de Xilazina (5 mg/kg) e Ketamina (80 mg/kg).

Para as análises histomorfométricas das placentas, as fêmeas de cada grupo experimental foram submetidas à heparinização prévia, seguida de perfusão intravascular com solução salina (solução aquosa de NaCl, 0,9%) e posterior fixação intravascular por 30 minutos (solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4), de acordo com método descrito por Chiarini-Garcia e Meistrich (2008). Posteriormente, o útero foi retirado, aberto com auxílio de tesoura e as placentas coletadas foram seccionadas sagitalmente. As metades foram imersas numa nova solução fixadora, na mesma concentração que a anterior, e mantidas a 4°C por mais 24h, para posterior conservação em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,4.

6. Biometria

Os fetos (n =323) presentes em ambos os cornos uterinos de todas as fêmeas gestantes dos grupos experimentais avaliados foram contados, isolados das respectivas placentas e pesados. Todos os discos placentários foram isolados e pesados individualmente. O cérebro e fígado dos fetos também foram pesados a fim de se estabelecer possíveis relações indicativas de crescimento intrauterino restrito (CIUR).

7. Processamento e análise das placentas para avaliações morfológicas e morfométricas

Após fixação, duas placentas de cada fêmea submetida à perfusão intravascular e fixadas em glutaraldeído, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e incluídas em resina plástica à base de glicol metacrilato, de acordo com Chiarini-Garcia et al (2011). Dos blocos montados, foram obtidos cortes histológicos de 3 μ m e 1,5 μ m de espessura, de forma semi seriada (coletando 1 a cada 10 cortes) que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1%.

Após o processamento, foi feita a caracterização histológica e descrição das alterações que serão descritas a seguir.

7.1 Área das regiões placentárias

Foram obtidas imagens digitais por meio do Scanner de Lâminas 3D Histec® de cortes histológicos placentários em que se evidenciaram as regiões de zona juncional, labirinto e placa coriônica. O programa de análise de imagens Case Viewer 1.4® foi utilizado para determinar a área (em mm) destas três regiões placentárias em cada grupo experimental. A Figura 6 exemplifica como foi feita a demarcação das áreas placentárias de interesse.

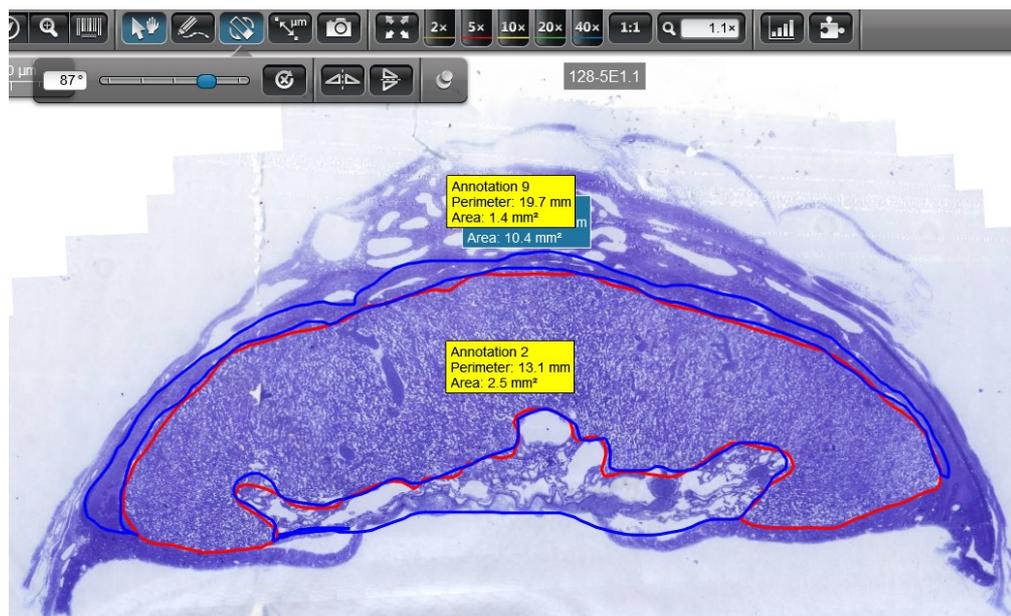


Figura 6: Fotomicrografia mostrando a seleção das áreas placentárias de interesse, conforme com sua localização e tamanho em mm^2 , através do software CaseViewer 1.4®.

7.2 Medida de vasos sanguíneos

7.2.1 Proporção volumétrica de grandes vasos placentários

Utilizando o programa de análise de imagens Case Viewer 1.4®, foram evidenciadas a presença e a área de vasos com diâmetro maior que $70 \mu\text{m}$ na região do labirinto placentário (grandes vasos). As áreas de cada grande vaso dentro do labirinto foram somadas e realizada a proporção volumétrica destes vasos em relação à área total de labirinto para cada placenta dos diferentes grupos experimentais.

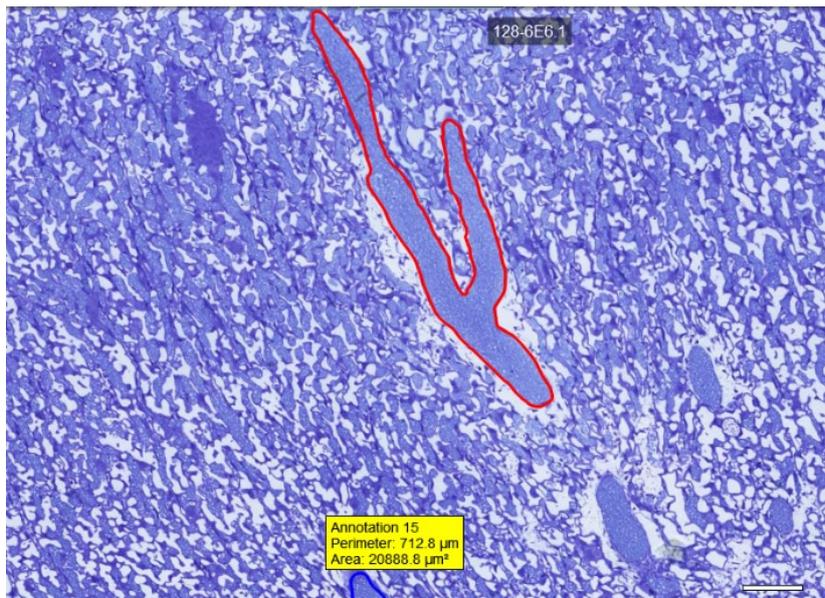


Figura 7: Fotomicrografia demonstrando a delimitação de grandes vasos sanguíneos presentes no labirinto placentário.

Software CaseViewer 1.4®. Barra: 100µm

7.2.2 *Proporção de vasos fetais e maternos*

Utilizando-se o programa Image ProExpress® (Media Cybernetics®), foi feita a determinação histológica de 276 pontos de interseção de graticulas no labirinto de cada placenta analisada. Os pontos foram definidos como: “vaso fetal”, caracterizado pela presença de hemácias nucleadas e limites definidos por células de sinusoidais; “espaço com sangue materno”, característico por hemácias maduras não nucleadas; e “células”, pontos de interseção sobre células sinusoidais características do labirinto placentário. Estes pontos foram posteriormente contados e sua proporção em valor absoluto e percentual foi comparada entre os grupos experimentais (Figura 8).

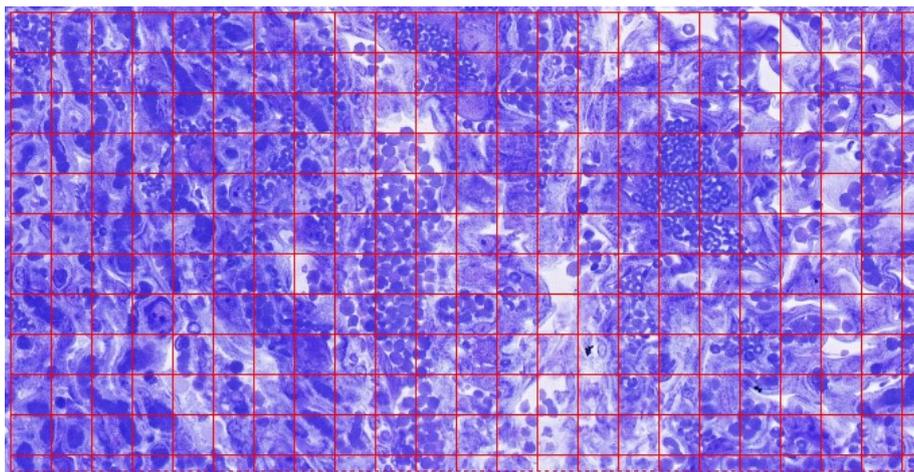


Figura 8: Fotomicrografia de placenta com graticula sobreposta, demonstrando a realização da contagem de pontos de interseção de graticula por meio do programa Image ProExpress® (Media Cybernetics®).

8. Análises estatísticas

Todos os parâmetros avaliados foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando-se o procedimento univariado do programa *Statistical Analysis System*® (SAS Institute, Cary, NC, EUA), sendo os dados analisados como um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Os efeitos das doses de cafeína sobre os parâmetros biométricos e histomorfométricos foram avaliados utilizando-se o modelo linear geral (GLM) do SAS. Nos eventos nos quais os tratamentos mostraram-se significativos, comparações múltiplas foram realizadas utilizando-se a probabilidade de diferenças (pdiff) entre médias de quadrados mínimos, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001), onde $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Características fenotípicas e parâmetros reprodutivos

A Tabela 1 resume as principais características dos animais dos diferentes grupos experimentais aos 11,5 e 17,5 dias gestacionais. Devido à necessidade prévia de obtenção de prenhez em cinco fêmeas

de cada grupo experimental, um número maior destas foi recrutado para se obter o número desejado, em se considerando a ocorrência de possíveis falhas reprodutivas. Conforme evidenciado pela Tabela 1, pode-se observar que o grupo submetido a altas doses de cafeína (D240) não completou a proporção mínima de prenhez, apresentando também vários óbitos. Portanto, em algumas análises estatísticas, este grupo foi excluído devido ao número de indivíduos insuficiente para um teste estatístico. Devido a esta dificuldade em se obter fêmeas prenhes no grupo de dose elevada, outras análises foram feitas para se investigar um possível efeito causador de infertilidade proveniente da cafeína.

É importante ressaltar que, durante a fase experimental, as fêmeas que consumiram cafeína apresentaram-se nitidamente mais agressivas, não só com seus manipuladores, mas também com os machos quando colocados juntos para o acasalamento. As fêmeas tratadas nas dosagens de 120 e 240 mg/kg apresentaram também sinais de estresse como perda de vibrissas e vocalização durante a manipulação (Figura 9), de acordo com o Guia de dor e stress em animais de laboratório (*Guidelines for pain and distress in laboratory animals*, 2017). Vale ressaltar que estes grupos experimentais também apresentaram maior porcentagem de incidência de óbitos que os demais.

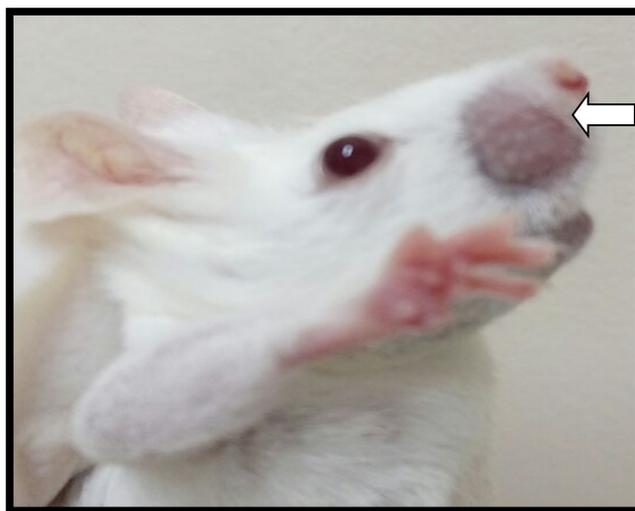


Figura 9: Fotografia de fêmea do grupo tratado com dose máxima de cafeína (D240) apresentando perda de vibrissas, (seta) sinal característico de estresse (*Guidelines for pain and distress in laboratory animals*, 2017)

Tabela 1: Características reprodutivas das fêmeas dos grupos experimentais controle (CC) e tratados com doses baixa (D60), moderada (D120) e alta (D240) de cafeína aos dias 11,5 (terço médio) e 17,5 (terço final) de gestação.

	Grupo CC		Grupo D60		Grupo D120		Grupo D240	
	11,5 DG n=10	17,5 DG n=10	11,5 DG n=11	17,5 DG n=11	11,5 DG n=12	17,5 DG n=12	11,5 DG n=12	17,5 DG n=12
Nº total de fêmeas prenhes	6/10	6/10	7/11	6/11	5/12	5/12	1/12	1/12
% fêmeas prenhes	60,0	60,0	63,6	54,5	41,7	41,7	8,3	8,3
No. médio fetos/fêmea	7 ± 1,1 ^a		6,5 ± 0,9 ^a		3,0 ± 0,9 ^b		0,9 ± 0,9 ^b	
% Reabsorção fetal	36,0		64,0		90,0		100,0	
Duração do diestro (dias)	1,75 ± 0,64 ^a		3,37 ± 0,55 ^b		3,00 ± 0,49 ^b		3,47 ± 0,54 ^b	

^{a,b} Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da linha diferem ($P < 0,05$)

A Tabela 1 apresenta o percentual de fêmeas gestantes por grupo experimental, onde se pode observar nos grupos tratados com doses moderada (D120) e elevada (D240) de cafeína um menor percentual de prenhez ($P < 0,05$) comparado aos grupos controle (CC) e de baixa dose (D60), sugerindo o efeito antifertilidade da referida substância.

Ainda em relação a parâmetros reprodutivos, foi avaliada a duração da fase de diestro do ciclo estral, que está representada na Tabela 1. Considerado como a fase lútea, o diestro apresenta duração média de 1 a 2 dias em condições fisiológicas normais (Freeman, 2006). Entretanto, o consumo de cafeína independente da dose, prolongou a duração do diestro, apresentando variação de 3 a 11 dias entre as doses mais elevadas ($P < 0,05$). Não se sabe exatamente a razão do prolongamento da fase de diestro, mas especula-se que o consumo excessivo de cafeína possa interferir no desenvolvimento folicular, fato este que merece mais investigações futuramente.

O número de fetos por fêmea nos diferentes grupos experimentais também foi afetado pelo consumo de cafeína, sendo menor nos grupos que receberam doses moderada e alta, em comparação aos

grupos controle e dose baixa ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Além do menor número de fetos, as fêmeas tratadas com cafeína apresentaram maior incidência de perda fetal, denominada reabsorção fetal. A reabsorção fetal é uma alteração resultante da morte do feto, com a sua reabsorção incompleta, ocorrendo após a formação da placenta. Esta perda fetal pode ser consequente a fatores ambientais, toxicológicos, número de fetos e stress (Figura 10) (Bolon, 2014). Conforme evidenciado na Tabela 1, 100, 90 e 64% das fêmeas dos grupos tratados com doses alta, moderada e baixa, respectivamente, apresentaram reabsorção fetal, enquanto apenas 36% das fêmeas do grupo controle apresentaram as referidas perdas. As referidas perdas no grupo controle podem ser justificadas pelo fato de que a reabsorção fetal é comum em camundongos submetidos ao stress (*Guidelines for pain and distress in laboratory animals*, 2017), e os animais controle foram submetidos ao stress da gavagem. Tais achados são indicativos da toxicidade da cafeína sobre o desenvolvimento fetal.

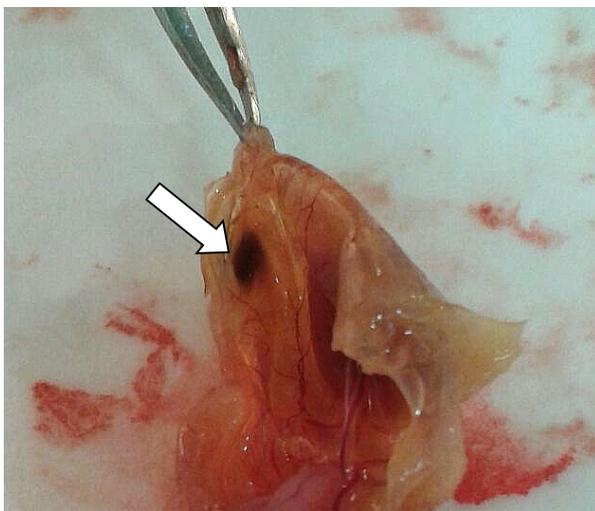


Figura 10: Fotografia de útero gravídico pertencente a fêmea do grupo experimental D240 (alta dose) ao dia 17,5 de gestação, contendo ponto de reabsorção fetal (seta branca)

2- Consumo de ração e ganho de peso corporal

Para uma análise mais apurada dos efeitos da cafeína sobre os animais em questão, questionou-se se as fêmeas tratadas não estariam consumindo menores quantidades de alimento. Tal questionamento

foi investigado em função de estudos prévios (Días, 2014; Gao et al, 2013) terem demonstrado que um consumo insuficiente de nutrientes, especialmente de quantidades consideráveis de proteína, levaria a um baixo índice de prenhez, além de maiores taxas de abortos espontâneos e formação de reabsorções fetais em roedores. Entretanto, ao se medir o consumo alimentar diário durante a gestação dos animais nos diferentes grupos experimentais, foi observado que a cafeína afetou o consumo de ração pelos grupos tratados sendo este maior naqueles animais, independente da dose de cafeína consumida, em comparação aos animais do grupo controle (Tabela 2, $P < 0,05$). Portanto, a dificuldade de se estabelecer a gestação destes animais, bem como o número reduzido de filhotes, não se deve a uma alimentação insuficiente. Sweeney et al. (2016) também trataram camundongos com cafeína e relataram um aumento de consumo de ração dose-dependente, em que menores doses de cafeína aumentavam mais o apetite destes animais. Entretanto, no presente estudo, o aumento observado no consumo de ração não foi influenciado pelas doses ingeridas.

Tabela 2: ganho de peso gestacional total e consumo de ração ao longo dos tratamentos

	Grupo CC (n=12)	Grupo D60 (n=13)	Grupo D120 (n=10)
Ganho de peso corporal gestacional total (g)	17,73 ± 2,46	11,62 ± 2,80	10,08 ± 0,95
Consumo diário de ração (g)	4,37 ± 0,23 ^a	5,24 ± 0,21 ^b	5,01 ± 0,22 ^b

^{a,b} Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da linha diferem ($P < 0,05$)

Os dados apresentados até o momento estão de acordo com os achados de vários estudos, dentre eles Huang et al. (2012) e Yadegari et al. (2016), que observaram menores taxas de prenhez, de implantação embrionária e ciclos estrais irregulares entre os animais que consumiram doses elevadas de cafeína. Há poucos estudos de investigação das vias toxicológicas da cafeína sobre a fertilidade de fêmeas. Kwak et al. (2017), ao estudarem fêmeas de ratos em estado pré-puberal, sugeriram que a exposição a altas doses de cafeína nesta fase da vida aumentaria a produção de estrógeno nos ovários,

levando a um desequilíbrio na regulação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, o que interferiria no ciclo estral e na maturação sexual destas fêmeas. No presente estudo, os dados obtidos indicam possíveis alterações nos níveis de hormônios gonadotróficos e esteroides ovarianos, conforme relatado por Kwak et al. (2017), embora análises destes hormônios não tenham sido realizadas.

Adicionalmente, fez-se a curva de ganho de peso gestacional dos animais tratados para se verificar se as alterações no consumo de ração afetariam aquele parâmetro (Figura 11). Como no grupo D240 (dose alta), apenas uma fêmea das 12 do grupo ficou gestante, não foi possível fazer a curva de ganho de peso gestacional para o referido grupo. Assim, os resultados obtidos mostram que já no DG 7,5 o ganho de peso dos animais tratados é menor quando comparado ao grupo controle, sendo esta diferença ainda mais pronunciada no grupo de dose moderada (D120) ($P < 0,05$) e permanecendo até o dia final da análise gestacional (17,5 DG). No entanto, no terço final da gestação (DG 17,5), as diferenças no ganho de peso entre os grupos tratados nas doses baixa e moderada não são mais observadas, sugerindo um ganho de peso compensatório no grupo D120 ao final da gestação. Mesmo havendo diferenças no ganho de peso gestacional, o ganho de peso gestacional total foi semelhante nos três grupos experimentais ($17,73 \pm 2,46$; $11,62 \pm 2,8$; $10,08 \pm 4,00$, respectivamente para os grupos CC, D60 e D120), vindo de encontro às nossas observações da ocorrência de ganho compensatório apresentado pelos grupos tratados com cafeína.

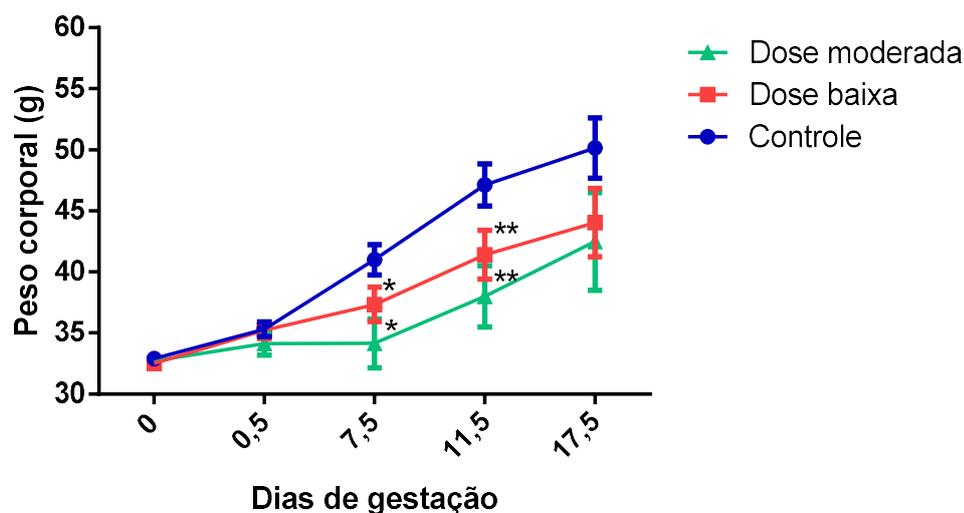


Figura 11: Evolução do peso corporal dos animais durante a gestação nos três grupos experimentais ($P < 0,05$).

3. Dados biométricos obtidos no terço médio da gestação (11,5 DG)

Os dados biométricos do terço médio da gestação (11,5 DG) estão apresentados na Tabela 3. Este período caracteriza-se por placenta recém-formada, já funcional, porém com tamanho ainda reduzido em relação ao seu desenvolvimento subsequente (Croy et al, 2014). Como pode ser observado na Tabela 3, os fetos nesta idade gestacional ainda não apresentam alterações de peso corporal. Entretanto, já é possível observar uma redução no peso placentário apenas no grupo tratado com baixas doses de cafeína (D60) ($P < 0,05$; Tabela 3). Animais tratados com doses moderadas (D120), apresentaram placentas significativamente mais pesadas que os demais, incluindo o grupo controle. Com esta observação intrigante, fez-se necessário o cálculo da eficiência placentária destes grupos.

Tabela 3: Parâmetros biométricos, fetais e placentários no terço médio gestacional (D11,5) nos grupos experimentais controle e tratados com doses baixa e moderada de cafeína

	Grupo CC	Grupo D60	Grupo D120
Peso fetal (g) (n = 203)	$0,034 \pm 0,002$	$0,035 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,002$
Peso placentário (g) (n = 203)	$0,076 \pm 0,003^a$	$0,066 \pm 0,002^b$	$0,084 \pm 0,003^a$
Eficiência placentária	$0,52 \pm 0,04^a$	$0,56 \pm 0,03^a$	$0,37 \pm 0,04^b$

^{a,b} Dados apresentados como média \pm erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da linha diferem ($P < 0,05$)

A eficiência placentária (EP) é um índice obtido a partir da divisão do peso médio dos fetos pelo peso médio das placentas. Quando a EP é elevada, menores placentas são capazes de manter o desenvolvimento e a viabilidade fetal, ou seja, elas possuem um melhor fluxo sanguíneo. Uma baixa EP é responsável por elevados índices de morte pré-natal (Wilson et al, 1998). Comparando-se os gráficos de peso placentário e eficiência placentária (Gráfico 10) entre si, pode-se observar que, mesmo apresentando placentas maiores, o grupo D120 deixa a desejar em sua EP, que é menor e provavelmente não consegue suprir os fetos de maneira satisfatória. Tal fato evidencia uma tentativa de compensação: a cafeína provavelmente alterou o fluxo sanguíneo da placenta, que por sua vez aumentou sua densidade na tentativa de suprir esta necessidade, evitando a formação de fetos com peso reduzido. Por outro lado, as placentas das fêmeas do grupo D60, mesmo sendo menores, nesta fase gestacional não apresentaram eficiência reduzida, tampouco peso fetal comprometido.

Portanto, os resultados aqui obtidos para esta idade gestacional revelam que baixas e moderadas doses de cafeína não interferem no desenvolvimento até o terço médio da gestação. Entretanto, em função do comprometimento da eficiência placentária, bem como pelas alterações de peso placentário observadas, supõe-se que os fetos poderiam sofrer prejuízo em seu desenvolvimento futuro.

4 Dados biométricos obtidos no terço final da gestação (17,5 DG)

Diferente dos resultados observados no terço médio, mudanças acentuadas foram observadas com a evolução da gestação. Aos 17,5 DG, pode-se observar placentas completamente formadas, com sua capacidade, funcionalidade e tamanho máximos (Croy et al, 2014). O consumo de cafeína em dose moderada (D120), mesmo tendo propiciado um aumento no peso placentário no terço gestacional médio (D11,5), observou-se que estas características não foram mantidas ao longo da gestação. Assim, no terço final (17,5 DG), as fêmeas tratadas com esta dose apresentaram placentas significativamente mais leves

(Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros biométricos, fetais e placentários no terço final gestacional (D17,5) nos grupos experimentais controle e tratados com doses baixa e moderada de cafeína

	Grupo CC	Grupo D60	Grupo D120
Peso fetal (g) (n = 120)	0,98 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,01 ^b	0,83 ± 0,02 ^c
Peso placentário (g) (n = 120)	0,190 ± 0,005 ^a	0,178 ± 0,006 ^a	0,145 ± 0,007 ^b
Eficiência placentária	5,52 ± 0,16	5,21 ± 0,17	5,90 ± 0,21

^{a,b} Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da linha diferem (P < 0,05)

Adicionalmente, pôde-se observar que todos o consumo de cafeína, independente da dose, afetou o peso fetal, sendo este inferior em comparação ao grupo controle (Tabela 4; P < 0,05), reforçando assim o efeito deletério do uso de cafeína durante a gestação.

Momoi et al. (2008) relataram que a modesta exposição materna diária à cafeína alterou o fluxo sanguíneo arterial embrionário e induziu a ocorrência de crescimento intrauterino restrito (CIUR) em camundongos. Huang et al (2012) relataram resultados semelhantes com ratos e camundongos tratados durante a gestação: CIUR, peso placentário e fetal reduzidos, e diminuição do comprimento fetal. Em humanos, CIUR é diagnosticado quando o peso fetal é dois desvios-padrão menor que a média de peso dos demais fetos na mesma idade gestacional (Chatelain, 2000). Em animais, ele pode ser evidenciado também quando a relação peso cérebro: peso órgão do feto se mostrar superior a 1, indicando que, devido a restrições ou toxicidades durante a vida intrauterina, o feto teve como prioridade a sua formação cerebral em detrimento da formação de outros órgãos, o que causou a redução de peso destes, fato este conhecido como “efeito de poupar o cérebro” (Bauer et al, 1998).

Durante as coletas de materiais biológicos, foi possível selecionar e pesar, aos 17,5 DG, o cérebro e o fígado de todos os fetos, com o objetivo de se diagnosticar a ocorrência de CIUR nos animais tratados. Entretanto, não foi observada diferença significativa na relação cérebro-fígado destes animais, descartando-se o acontecimento de CIUR nos fetos dos grupos tratados com cafeína (P > 0,05).

Dessa forma, os fetos apresentam alteração no peso, sendo mais leves naqueles grupos experimentais. A EP também foi analisada durante o terço final da gestação. Ao contrário do que foi observado durante o terço médio, aos 17,5 DG não se observou comprometimento na EP. Assim, supõe-se que o suprimento sanguíneo nos estágios mais tardios de sua gestação seria comprometido pelo consumo de cafeína, afetando a eficiência placentária e conseqüentemente, o peso dos fetos, que passam a ser mais leves no terço gestacional final (Tabela 4).

5. Dados histomorfométricos da placenta

Os dados apresentados anteriormente estão de acordo com o que foi descrito por muitos autores (Yadegari et al, 2016; Huang et al, 2013; Momoi et al, 2008). Basicamente, a pesquisa do impacto do consumo de cafeína durante a gestação se baseia nas características biométricas fetais e nas conseqüências sobre a prole após a exposição intrauterina. Entretanto, estudos que investigam alterações histomorfométricas placentárias são escassos.

Para o melhor entendimento das alterações biométricas placentárias e fetais decorrentes do consumo gestacional de cafeína, o estudo deste órgão se faz necessário e importante. Alguns autores sugerem que alterações placentárias venham a ocorrer na região do labirinto sem, entretanto, haver uma descrição do tipo de alteração observada. Até o momento, é sugerido que haja uma alteração na vascularização placentária desta região (Bolon, 2014). Dessa forma, para a obtenção de dados mais precisos, foram realizadas análises histomorfométricas de placentas de fêmeas tratadas com doses baixa e moderada de cafeína, cujos resultados serão descritos a seguir.

1.1 Proporção entre áreas placentárias

Uma das hipóteses deste estudo era que, uma vez que as placentas dos animais tratados com cafeína apresentam-se biometricamente mais leves se comparadas às do grupo controle, seria encontrada alguma alteração nas áreas placentárias, provavelmente na região do labirinto, responsável pela troca de

substâncias entre mãe e feto. Assim, esperava-se uma área menor de labirinto, ou seja, uma menor proporção em relação às demais áreas placentárias.

Entretanto, como pode ser observado na Tabela 5, o consumo de cafeína não afetou as áreas das diferentes regiões placentárias. Dessa forma, as devidas proporções de labirinto, placa coriônica e zona juncional não se alteraram por influência do consumo de cafeína, e, portanto, infere-se que a redução do peso placentário se deu igualmente em todas as suas regiões, de forma proporcional, sem prejuízo de uma região em particular.

Tabela 5: Dados histomorfométricos das placentas no terço final da gestação (D17,5) nos grupos experimentais

	Grupo CC	Grupo D60	Grupo D120
Área de labirinto (mm²)	11,2 ± 0,8	12,1 ± 0,6	10,0 ± 0,7
Área de zona juncional (mm²)	1,7 ± 0,7	3,5 ± 0,6	2,5 ± 0,6
Área de placa coriônica (mm²)	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Proporção volumétrica de grandes vasos (%)	0,012 ± 0,004	0,006 ± 0,003	0,003 ± 0,003

1.2 Proporção de grandes vasos do labirinto

Em se observando a disposição de vasos do labirinto, pôde-se notar a presença de vasos de diferentes calibres: pequeno (diâmetro $\leq 50\mu\text{m}$), médio (diâmetro entre 50 e 69 μm) e grande (diâmetro $\geq 70\mu\text{m}$). Uma vez que a presença de grandes vasos foi verificada nas placentas estudadas (Figura 6), optou-se por fazer um estudo de sua disposição entre os grupos tratados. Ao se comparar proporcionalmente a soma das áreas de todos os grandes vasos placentários em relação ao labirinto, verificou-se que esta foi semelhante nos grupos estudados (Tabela 5).

1.3 Tipos de vasos do labirinto

A ausência de alterações na proporção de áreas placentárias, bem como a disposição normal

de grandes vasos encontrada entre os grupos tratados, trouxeram dados intrigantes sobre quais possíveis alterações estariam ocorrendo no tecido placentário em decorrência do consumo de cafeína por gestantes, uma vez que estas não foram evidenciadas além da biometria. Portanto, fez-se necessário o estudo da disposição dos vasos do labirinto de forma a contabilizar os fetais e aqueles de origem materna.

O estudo dos vasos do labirinto placentário é possível devido às características individuais que cada um deles apresenta. Vasos fetais são separados do sangue materno por células gigantes sinusoidais e apresentam hemácias globosas, nucleadas, não maduras (Croy et al, 2014). O sangue materno, por sua vez, flui por entre os vasos fetais e apresenta hemácias em sua forma clássica, pequenas e não nucleadas (Figura 12).

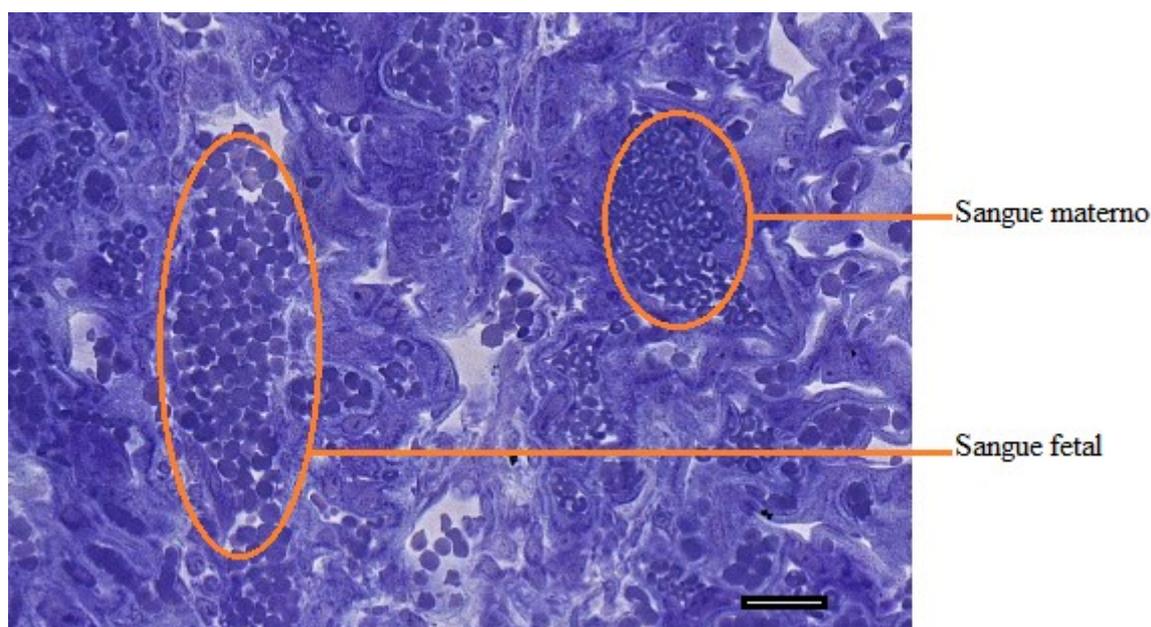


Figura 12: Fotomicrografia representando as diferenças entre sangue fetal, com hemácias globosas e nucleadas, e sangue materno, com hemácias já maduras. Aumento: 35; Barra: 12,5µm.

A análise dos tipos de vasos encontrados no labirinto encontra-se representada na Figura 13. Apesar de o sangue materno desta região placentária não fluir por meio de vasos, utilizou-se o termo “vaso materno” para designar a região contabilizada como ocupada por sangue materno; o termo “vaso

fetal” refere-se aos pontos contabilizados como de região fetal; e o termo “células” refere-se às células constituintes do labirinto, basicamente as células gigantes sinusoidais que recobrem os vasos fetais.

Conforme evidenciado na Figura 12, pode-se observar uma drástica redução na irrigação de origem materna nos animais tratados com doses moderadas de cafeína. Esta redução vem acompanhada de um aumento de tecido fetal, em que se pode notar uma maior presença de vasos fetais, bem como de células que recobrem estes vasos. Tal achado se mostrou intrigante, uma vez que evidencia um possível mecanismo de compensação fetal em resposta a uma menor irrigação materna.

Um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento intrauterino é a capacidade materna em fornecer suprimento adequado de nutrientes e oxigênio, permitindo que o feto atinja seu potencial de crescimento, desenvolvimento e sobrevivência pós-natal (Wu et al, 2004). Este achado talvez possa explicar parte dos dados biométricos encontrados: uma vez que a irrigação materna é insuficiente, observa-se um menor peso das placentas, uma redução na eficiência placentária e, conseqüentemente, filhotes de peso inferior aos do grupo controle. Mais investigações sobre o mecanismo de ação da cafeína na placenta de animais devem ser feitas.

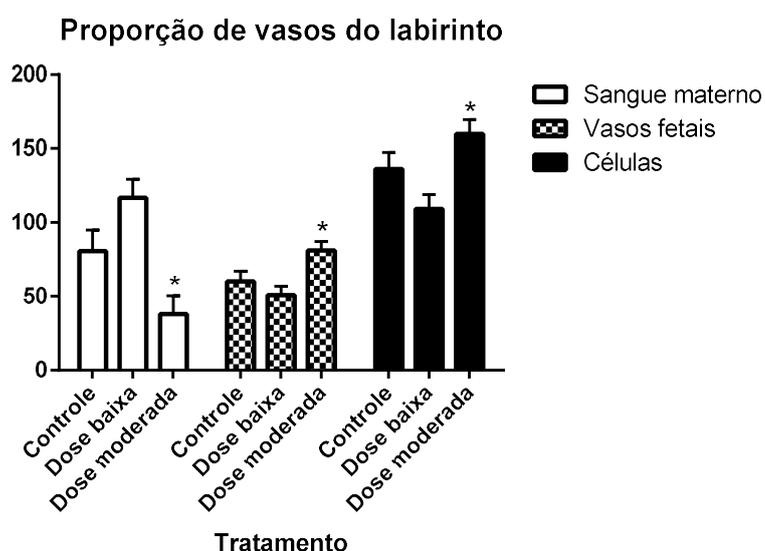


Figura 13 : Proporção de vasos sanguíneos maternos e fetais e componentes do labirinto nos diferentes grupos experimentais

(* P < 0,05)

2. Outras observações morfológicas

Estudos biométricos e morfológicos foram realizados nos grupos controle e doses baixa e moderada de cafeína. Isto se deve ao fato de que, em cada idade gestacional (11,5 DG e 17,5 DG), obteve-se somente uma fêmea gestante do grupo alta dose (D240), o que impossibilitou a realização das análises estatísticas incluindo este grupo experimental. Enquanto as placentas do grupo controle apresentaram-se histologicamente homogêneas, placentas dos grupos tratados com D60 e D120 mostraram alterações em sua estrutura, diga-se uma grande invaginação, aparentemente oriunda de uma artéria formadora de canal central, que apresentou estrutura diferenciada em relação à sua morfometria normal (Figura 14: A, B, C). Ao ser observada em maior aumento, a superfície destas invaginações mostrou-se homogênea e com revestimento semelhante ao dos vasos componentes da decídua materna, não se tratando de erros de técnica ou artefatos microscópicos. Assim, maiores investigações morfológicas e funcionais são necessárias para se desvendar a real característica de tais invaginações.

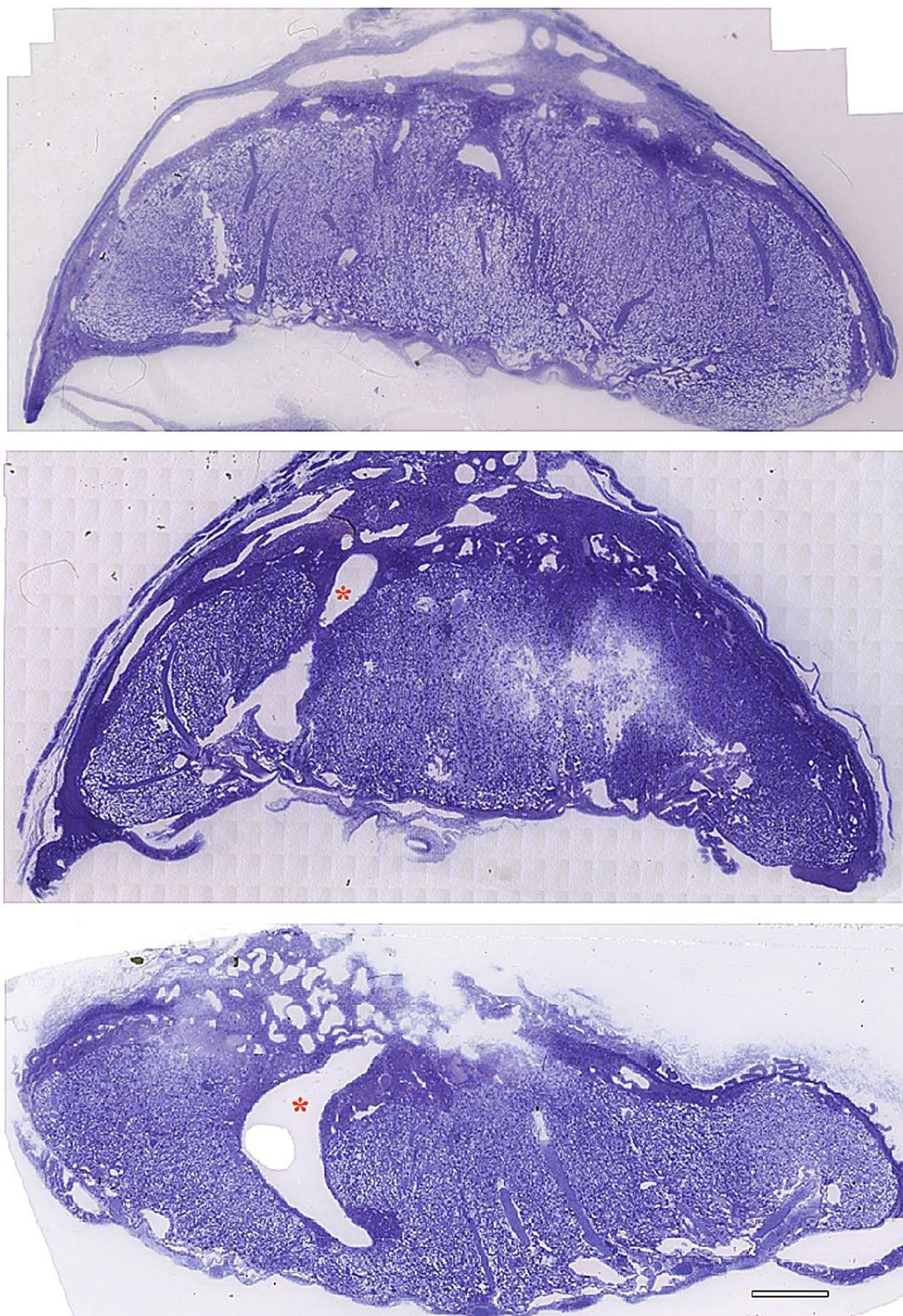


Figura 14: Fotomicrografias comparativas de placentas no terço final de gestação (D17,5): A Grupo Controle; B Grupo D60, C Grupo D120. Presença de aumento de diâmetro de região de invaginação no labirinto (asteriscos vermelhos) nos grupos D60 e D120 (B, C), em comparação à mesma região evidenciada no grupo controle (A). Barra: 500 μ m

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cafeína é uma das substâncias mais popularmente consumidas no mundo, seja por homens, mulheres gestantes ou não e crianças. Muito já se sabe sobre suas consequências durante o desenvolvimento pré-natal em animais, embora estudos com humanos sejam ainda inconclusivos, devido a vieses de pesquisa e aspectos éticos sérios. As doses indicadas de cafeína durante a gestação também são constantemente questionadas por novos estudos, e têm variado entre 0 a 300 mg, de acordo com estes achados.

Pouco se sabe sobre o mecanismo de ação e alterações histomorfométricas da cafeína nos períodos pré e pós-concepção. Os achados biométricos deste estudo reafirmam a necessidade de se evitar a cafeína durante o período gestacional, especialmente durante o terço final, quando a degradação da cafeína se torna muito comprometida. Por outro lado, os achados histomorfométricos e inéditos deste estudo apontam para uma vascularização comprometida ao fim da gestação, em que não há sangue materno suficiente para a nutrição adequada do feto.

Novos estudos relacionados a outros parâmetros reprodutivos se fazem necessários para complementação deste estudo, especialmente os relacionados à função ovariana pré-concepção. Além disso, estudos funcionais como o uso de marcadores placentários também são plausíveis, para investigar a fundo o que realmente ocorre na vascularização placentária com o consumo crônico de cafeína.

Entretanto, diante do que foi discutido ao longo deste trabalho, a cafeína, inclusive em pequenas doses, deveria ser evitada ao longo de toda a gestação de humanos, especialmente no último trimestre. Uma vez que sua quantificação é difícil e ela está presente em vários tipos de alimentos, seu consumo acidental já é considerável, e, portanto, sua ingestão deveria ser evitada ou feita minimamente durante a gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldridge, A., Bailey, Neims, A. 1981. The disposition of caffeine during and after pregnancy. *Semin Perinatol*;5:310–4.
- Arnaud, M.J. 1993. Metabolism of caffeine and other components of coffee. In: Garattini S. *Caffeine, Coffee, and Health*. New York: Raven Press; 43–95. Arnaud, M.J. 1987. “The pharmacology of caffeine”. *Prog Drug Res*; 31:273–313.
- Axelsson G, Rylander R, Molin I. 1989. Outcome of pregnancy in relation to irregular and inconvenient work schedules. *Br J Ind Med*;46:393–398.
- Bauer, R., Walter, B., Hoppe, A., et al. 1998. Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*): a study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Exp Toxic Pathol*;50:59-65.
- Ballesteros-Yanez, I., Castillo, C.A., Amo-Salas, M., Albasanz, J.L., Martin, M. 2012. Differential effect of caffeine consumption on diverse brain areas of pregnant rats. *J Caffeine Res*; 2(2): 90-98.
- Barone, J.J., Roberts H.R. 1996. Caffeine consumption. *Food Chem Toxicol*; 34:119–29.
- Bech, B.H., Nohr, E.A., Vaeth, M., Olsen, J. 2005. “Coffee and fetal death: a cohort study with prospective data”. *Am J Epidemiol.*;182(10).
- Bech, B.H., Obel, C., Henriksen, T.B., Olsen, J. 2007. Effect of reducing caffeine intake on birth weight and length of gestation: randomised controlled trial. *BMJ*.
- 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.
- Bowes, A.D. 1989. Caffeine, Bowes’ and Church’s food values of portions commonly used. Philadelphia: Lippincott, 261p.

- Bracken, M.B., Triche, E., Grosso, L., Hellenbrand, K., Belanger, K., Leaderer, B.P. 2002. Heterogeneity in assessing self-reports of caffeine exposure: implications for studies of health effects. *Epidemiology*;13(2):165-71.
- Browne, M.L., Bell, E.M., Druschel, C.M., Gensburg, L.J., Mitchell, A.A., Lin, A.E., et al. 2007. Maternal caffeine consumption and risk of cardiovascular malformations: Birth Defects Research. *Clinical and Molecular Teratology*;79(7):533-43.
- Burke, L., Desbrow, B., Spriet, L. 2013. Caffeine for sports performance. United States of America: Human Kinetics.
- Burton, G.J., Kaufmann, P., Huppertz, B. 2006. Anatomy and Genesis of the Placenta. In: Neill, J.D., et al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; 189-243.
- Butt, M.S., Sultan, M.T. 2011. Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. 2002. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *Plos One*;7(4):1-5.
- Chatelain P. 2000. Children born with intrauterine growth retardation (IUGR) or small for gestational age (SGA): Long term growth and metabolic consequences. *Endocr Regul*; 34:33-6.
- Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press. 2008:95-107.
- Chiarini-Garcia H, Parreira GG; Almeida FRCL. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN. *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. 2011:3-18.
- Christian, M.S., Brent, R.L. 2001. Teratogen Update: Evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology*; 64:51-78.

- Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier; 808p.
- D'Amicis, A., Viani, R. 1993. The consumption of coffee. In: Garattini S. *Caffeine, coffee and health*. New York: Raven Press;1–16.
- Dangelo JG, Fattini CA. *Anatomia humana básica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2002. 200p.
- Del Castillo, N., Jiménez-Moleón, J.J., Olmedo-Requena, R., Martínez-Ruiz, V., et al. 2015. Perinatal outcomes of prematurity and birth weight according to maternal caffeine consumption. *Nutr Hosp*;32:2658-64.
- Dews, P.B. 2011. *Caffeine: Perspectives from recent research*. Berlin: Springer Science & Business Media. 260p.
- Díaz, P.; et al.2014. The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. *Biology of Reproduction*; 91(4)1-10.
- Florman HM, Ducibella T. Fertilization in Mammals. In: Neill JD et al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; 2006.55-112.
- EFSA. 2015. Scientific opinion on the safety of caffeine. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA J*;13(5),4102.
- Elmazar, M.M.A., McElhatton, R., Sullivan, F.M. 1981. Acute Studies to Investigate the Mechanism of Action of Caffeine as a Teratogen in Mice. *Human Toxicology*; 1:53-63.
- FDA – (U. S. Food and Drug Administration). 2002. Center for Science and Public Interest Publisher of Nutrition Action Health. Letter.Frary, C.D., Johnson, R.K., Wang, M.Q.2005. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J Am Diet Assoc*; 105: 110–113.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). 1980. Caffeine and pregnancy. *FDA Drug Bull*; 10:19–20.

- Frary, C.D., Johnson, R.K., Wang, M.Q. 2005. Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. *J Am Diet Assoc*; 105: 110–113.
- Freeman, M. E., 2006. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In: Neill, J.D., et al. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3 ed (Elsevier). New York: Elsevier; 189-243.
- Fujii, T., Sasaki, H., Nishimura, H. 1969. Teratogenicity of caffeine in mice related to its model of administration. *Jap J Pharmac*.
- Gao, H.; Yallampalli, U.; Yallampalli, C. Gestational protein restriction affects trophoblast differentiation. *Front. Biosci*. v. 5. p. 591-601, 2013.
- Gaskins, A.J., Rich-Edwards, J.W., Williams, P.L., et al. 2016. Pre-pregnancy caffeine and caffeinated beverage intake and risk of spontaneous abortion. *Eur J Nutr*.
- Gilbert EF, Pistey WR. 1973. Effect on the offspring of repeated caffeine administration to pregnant rats. *J Reprod Fertil*; 34(3):495-99
- Goyan JE. Food and Drug Administration news release number. Washington DC: Food and Drug Administration; 1980.
- Grant. I., Cartwright, J.E., Lumicisi, B., Wallace, A.E., Whitley, G.S. 2012. Caffeine Inhibits EGF-Stimulated Trophoblast Cell Motility through the Inhibition of mTORC2 and Akt. *Endocrinology*; 153(9):4502–10.
- Greenwood, D.C., Thatcher, N.J., Ye, J., Garrard, L., et al. 2014. Caffeine intake during pregnancy and adverse birth outcomes: a systematic review and dose–response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*; 29:725–34.
- Grosso, L.M., Bracken, M.B. 2005. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol*; 15:460-6.
- Guidelines for pain and distress in laboratory animals: responsibilities, recognition and alleviation

[acesso em 20/04/2017].Disponível em: <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents.pdf>

- Harland, B.2000. Caffeine and nutrition. *Nutrition*; 16(7):522-6.
- Huang, J., Zhou, S., Ping, J., Pan, X., Liang, G., Xu, D., et al. 2012. Role of p53-dependent placental apoptosis in the reproductive and developmental toxicities of caffeine in rodents. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;39:357-63.
- Jahanfar, S., Jaafar, S.H. 2015. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Issue 6.
- Jahanfar, S., Jaafar, S.H. 2013. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Issue 2.
- Jahanfar, S., Jaafar, S.H. 2009. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*;Issue 2.
- Kalow W, Tang B-K. Caffeine as a metabolic probe: Exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1991;49:44–48.
- Klebanoff, M., Levine, R.J., Clemens, J.D., Wilkins, D.G. 2002. Maternal Serum Caffeine Metabolites and Small-for-Gestational Age Birth. *Am J Epidemiol*;(155)1:32-37.
- Klebanoff M, Levine R, DerSimonian R, Clemens J, Wilkins D. 1998.Serum caffeine and paraxanthine as markers for reported caffeine intake in pregnancy. *Ann Epidemiology*;8(2):107–111.
- Lechat, M.F., Borlee, I., Bouckaert, A., Misson, C. 1980. Caffeine study. *Science*;207:1296–97.
- Leon, D., Albasanz, J.L., Ruiz, M.A., Fernandez, M., Martin, M. 2002. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem*;82:625–34.

- Li, J., Zhao, H., Song, J.M., Zhang, J., Tang, Y.L., Xin, C.M. 2015. A meta-analysis of risk of pregnancy loss and caffeine and coffee consumption during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet.*;130(2):116-22.
- Linn, S., Schoenbaum, S.C., Monson, R.R., Rosner, B., Stubblefield, P.G., Ryan, K.J.1982. No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy. *N Engl J Med*; 306:141-5.
- Kwak, Y., Choia, H., Baeb, J., Choic, Y., Roh, J. 2017. Peri-pubertal high caffeine exposure increases ovarian estradiol production in immature rats. *Reproductive Toxicology* 69:43-52.
- Ma, Z.L., Wan, G., Lu, W., Cheng, X., Chuai, M., et al. 2015. Investigating the effect of excess caffeine exposure on placental angiogenesis using chicken 'functional' placental blood vessel network. *J. Appl. Toxicol.*
- Martin, T., Bracken, M. 1987. The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *Am J Epidemiol*;126:813– 821.
- Momoi, N., Tinney, J.P., Liu, L.J., Elshershari, H., Hoffmann, P.J., et al. 2008. Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 294: 2248–56.
- MOORE, K. *Embriologia Básica*. 8ª Edição. Elsevier, 2013. 376p.
- Mossman HW. 1937. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterin structures. *Contrib Embryol*;26:129-246.
- Mose, T., Kjaerstad, M.B., Mathiesen, L., Nielsen, J.B., Edelfors, S., Knudsen, L.E. 2008. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. *J Toxicol Environ Health*; 71: 984–991.

- Nehlig, A. 1999. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*;23: 563–576.
- Nishimura, H., Nakai, K. 1960. Congenital malformations in the offspring of mice treated with caffeine. *Proc Soc Exp. Biol Med*; 104:140-2.
- Olchowik, G., Chadaj-Polberg, E., Tomaszewski, M., Polberg, M., Tomaszewska, M. 2011. The influence of caffeine on the biomechanical properties of bone tissue during pregnancy in a population of rats. *Folia Histochem Cytobiol*;49:504–511.
- Olsen, J. 1991. Cigarette smoking, tea and coffee drinking and subfecundity. *Am J Epidemiol*;133:734–9.
- 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.
- Parsons, W., Neims, A. 1978. Effect of smoking on caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther*;24:734–739.
- Partosch, F., Mielkeb, H., Stahlmanna, R., Gundert-Remy, U. 2015. Caffeine intake in pregnancy: Relationship between internal intake and effect on birth weight. *Food Chem Toxicology*; 86: 291–7.
- Peacock, J., Bland, J., Anderson, H. 1991. Effects on birthweight of alcohol and caffeine consumption in smoking women. *J Epidemiol Community Health*;45:159–163.
- 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. *Fertil Steril*. 2008;88:176-87.

- Poulsen, M.S., Rytting, E., Mose, T., Knudsen, L.E. 2009. Modeling placental transport: Correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicology in Vitro*;1380–86.
- Reagan-Shaw, S., Nihao, M., Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal – Life Sciences Forum*. Vol 22. 2007.
- Reynolds, L.P., Borowicz, P.P., Cation, J.S., et al. 2010. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol*;54:355-65.
- Rhee, J., Kim, R., Kim, Y., Tam, M., Lai, Y., Keum, N., Oldenburg, C.E. 2015. Maternal Caffeine Consumption during Pregnancy and Risk of Low Birth Weight: A Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *Plos One*; 10(7):1-18.
- Reis, A. M., Ribeiro, L.G.; Ocarino, M.; Boeloni, J.N.; et al. 2015. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskelet Disord*;16:10.
- Reynolds LP, Borowicz PP, Cation JS et al. 2010. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol*;54:355-65.
- Rossant, J., Cross, J.C. 2001. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews*;2:538-48.
- Serapiao-Moraes, D.F., Souza-Melo, V.S., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Faria, T.S. 2013. Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring. *Eur J Nutr*;52:1891-1900.
- Sesardic, D., Pasanen, M., Pelkonen, O., Boobis, A.R. 1990. Differential expression and regulation of members of the cytochrome P4501A gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis*; 11:1183–88.

- Silva, C.G., Metín, C., Fazeli, W., Machado, N., Darmopil, S., et al. 2013. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Science Translational Medicine*;5:197.
- Shai L, Stephen CS, Richard RM, Bernard R, Phillip GS, Kenneth J. 1982. No association between coffee consumption and adverse outcomes of pregnancy. *N Engl J Med*;306:141–5.
- Silva JF. Efeitos dos hormônios tireoidianos na cinética de migração das células trofoblásticas e no perfil endócrino, angiogênico e imune da placenta de ratas e na expressão gênica das células trofoblásticas de camundongos. 162f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), UFMG, Belo Horizonte, 2014.
- Silva, J.F., Serakides, R. 2016. Intrauterine trophoblast migration: a comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion & Migration*.
- Stein, Z., Susser, M. 1991. Miscarriage, caffeine, and the epiphenomena of pregnancy: The causal model. *Epidemiology*;2:163–167.
- Sweeney, P., Levack, R., Watters, J., Xu, Z., Yang, Y. 2016. Caffeine increases food intake while reducing anxiety-related behaviors. *Appetite*;101:171-177.
- Terada, M., Nishimura, H. 1975. Mitigation of caffeine-induced teratogenicity in mice by prior chronic caffeine ingestion. *Teratology*;12:79-82.
- Tomaszewski, M., Olchowik, G., Tomaszewska, M., Burdan, F. 2012. Use of X-ray microprobe to diagnose bone tissue demineralization after caffeine administration. *Folia Histochem Cytobiol*;43:43.
- Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, et al. 2001. The effect of pregnancy on cytochrome p4501a2, xanthine oxidase, and n-acetyltransferase activities in humans. *Clin Pharmacol Ther*;70:121–125.

- Vik T, Bakketeig LS, Trygg KU, Lund-Larsen KL, Jacobsen G. 2003. High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender-specific effects on fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol*; 17:324-31.
- Van't, H. W. 1982. Caffeine in pregnancy. *Lancet*;1:10-20.
- Wang Y. Basic knowledge of functional experiment. In: Hu HZ. *Medical Functional Experimental Tutoria*. Science Press, Beijing. 2005.
- Weng, X., Odouli. R., Li, D,K. 2008. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*;198:279.
- 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.
- Wu, G., Bazer, F., Cudd, T. A., et al. 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J Nut*; 134:2169-72.
- Yadegari, M., Khazaei, M., Anvari, M., Eskandari, M. 2016. Prenatal Caffeine exposure impairs pregnancy in rats. *Int J Fertil Steril*; 9(4):558-62.

ANEXO 1: Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG)

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 395 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Efeitos do consumo de cafeína durante a gestação e alterações na placenta de camundongos”, que tem como responsável Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado espira-se em 09/12/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 395 / 2015, related to the Project entitled “Effects of caffeine consumption during pregnancy and placental alteration in mice”, under the supervision of Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificate expires in 09/12/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 09/12/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO 2: Publicação do artigo de revisão proveniente deste trabalho – Journal of Pharmacy and Pharmacology

