

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA**

**Proliferação, angiogênese, apoptose e expressão da
ciclooxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções
tireoidianas e na placenta e ovário de ratas com
hipotireoidismo**

Juneo Freitas Silva

**Belo Horizonte – MG
2011**

Juneo Freitas Silva

Proliferação, angiogênese, apoptose e expressão da cicloxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções tireoidianas e na placenta e ovário de ratas com hipotireoidismo

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientadora: Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2011**

Silva, Juneo Freitas, 1985-

S586p Proliferação, angiogênese, apoptose e expressão da ciclooxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções tereoidianas e na placenta e ovário de ratas com hipotireoidismo / Juneo Freitas Silva. – 2011.

123 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides


Co-orientadora: Natália de Melo Ocarino


Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia


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

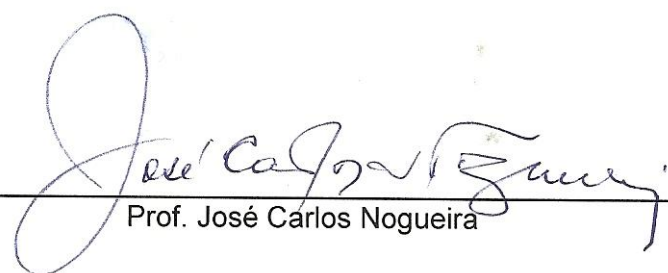
CDD – 636.089 607 5

Dissertação defendida e aprovada em 04 de fevereiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof.^a Rogéria Serakides
Orientador


Prof. Guilherme Ribeiro do Valle


Prof. Ernane Fagundes do Nascimento


Prof. José Carlos Nogueira

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Sebastião Cardoso Silva e Maria Edith Freitas Silva que sempre me apoiaram e acreditaram em meus sonhos.

“Para realizar grandes conquistas devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre está presente em todas as realizações da minha vida me dando força e amparo.

Aos meus queridos pais Maria Edite e Sebastião Cardoso, que sempre estiveram ao meu lado me possibilitando a realização deste trabalho. Sei que abriram mão de muitas coisas em prol de mim. Obrigado pelo amor incondicional!

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

Ao meu sobrinho Yan Gabriel, pelo carinho e boas risadas.

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

Aos meus tios e primas, particularmente Elizete, pela amizade e apoio constante.

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

À Profa. Rogéria Serakides, por ter acreditado e investido em mim, pela orientação, amizade e apoio recebidos deste quando iniciei como aluno de Iniciação Científica. Obrigado por todas as horas de ensinamentos que me fizeram melhorar como pessoa e como profissional e que vou levar para o resto da minha vida.

À Profa. Natália de Melo Ocarino, que sempre me acompanhou e orientou deste a época de Iniciação Científica. Obrigado pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio constante. Obrigado pelas lições e pela pessoa que sou hoje.

À Jankerle Boeloni, minha “irmã”, que sempre esteve ao meu lado me ajudando no que era preciso. Obrigado pelas horas de conversa, risadas e ensinamentos.

Aos ex-alunos da Patologia e queridos amigos, particularmente, Cintia, Raquel, Eduardo, Aline Pontes, Ju Paniago, Aline Viott e Custódio, que fizeram parte dessa trajetória, muito obrigado pelas horas de descontração.

Aos amigos e colegas da Patologia, particularmente Amanda, Erica, Silvia, Teane, Ju Saes, Ana Patricia, Luciana, Ana Luiza, Auricélio, Valéria, Marina, Eliana e Saira, obrigado pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às ex-técnicas do Laboratório de Patologia, Marilene, Mel e Rosi, obrigado por toda a ajuda na realização deste trabalho e pelas boas risadas que demos juntos.

Às funcionárias da limpeza e aos porteiros Fábio e Ney, obrigado pela convivência agradável e cooperação.

Aos ex-alunos de Iniciação Científica, particularmente, Luana, Renata, Phelipe e Guilherme, pela ajuda constante e amizade.

Às ex-alunas de Iniciação Científica, Daniele e Paula, que foram imprecendíveis para a realização deste trabalho. Obrigado pela ajuda, disponibilidade, amizade e horas de descontração.

Às atuais alunas de Iniciação Científica, Raquel, Fernanda e Silvia, obrigado pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Setor de Patologia, Renato de Lima Santos, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Ernane Fagundes do Nascimento e Rosilene Ecco, muito obrigado pelos ensinamentos e pelo profissional que sou hoje.

Aos professores do DCCV, particularmente Alan Maia Borges, Eliane Gonçalves de Melo e José Monteiro da Silva, obrigado pela disponibilidade e ajuda.

Aos alunos e ex-alunos do DCCV, particularmente Paula, Bruno, Fátima, Fabíola, Karen e Mário, obrigado pela ajuda, amizade e agradáveis e infindáveis horas na companhia da imunoistoquímica.

Aos animais, especialmente, Tamy, Princesa, Xuxa, Paquito, Pitucha e as ratinhas, razão pela qual escolhi esta profissão.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	22
CAPITULO 1: Revisão de literatura.....	23
1. Foliculogênese, vascularização e angiogênese ovariana	23
1.1 Angiogênese folicular.....	24
1.2 Angiogênese luteal.....	26
1.3 Fatores ovarianos angiogênicos.....	27
1.3.1 <i>Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs)</i>	27
1.3.2 <i>Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)</i>	29
1.3.3 <i>Angiopoetinas (Angs)</i>	29
1.3.4 <i>Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs)</i>	30
1.3.5 <i>Outros potenciais fatores angiogênicos</i>	30
2. Atividade ovariana proliferativa e apoptótica.....	31
3. Cicloxigenases e seu papel na atividade e vascularização ovariana.....	34
4. Fecundação e blastogênese.....	36
5. Implantação embrionária.....	36
6. Reconhecimento materno da gestação	39
7. Decidualização.....	40
8. Placentação	41
8.1 <i>Diferenciação trofoblástica</i>	43
8.2 <i>Angiogênese placentária</i>	45
8.3 <i>Fatores angiogênicos placentários</i>	46
9. Proliferação e apoptose durante a gestação.....	48
10. Efeito dos hormônios tireoidianos na reprodução da fêmea.....	49
CAPITULO 2: Atividade proliferativa, angiogênica e apoptótica e expressão da cicloxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções tireoidianas.....	55
INTRODUÇÃO.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	59

<i>Indução das disfunções tireoidianas.....</i>	59
<i>Expressão imunoistoquímica de CDC-47.....</i>	60
<i>Quantificação de corpos apoptóticos.....</i>	65
<i>Expressão imunoistoquímica de VEGF e FLK-1.....</i>	69
<i>Expressão imunoistoquímica de COX-2.....</i>	75
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÕES.....	83
CAPITULO 3: Desenvolvimento placentário e fetal e atividade luteal de ratas com hipotireoidismo.....	85
INTRODUÇÃO.....	85
MATERIAL E MÉTODOS.....	86
RESULTADOS.....	90
<i>Indução do hipotireoidismo.....</i>	90
<i>Número e características dos fetos.....</i>	91
<i>Histomorfometria placentária</i>	92
<i>Análise imunoistoquímica da placenta.....</i>	101
<i>Avaliação da apoptose na placenta</i>	107
<i>Avaliação histomorfométrica, imunoistoquímica e de túnel nos corpos lúteos.....</i>	108
DISCUSSÃO.....	117
CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
ANEXO 1.....	145
ANEXO 2.....	146
ANEXO 3.....	147
ANEXO 4.....	148

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1.	Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB).....	58
Tabela 2.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da concentração plasmática de T4 livre nos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.....	60
Tabela 3.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso da tireóide dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.....	60
Tabela 4.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 na camada da granulosa dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo nas fases de proestro-estro e metaestro-diestro.....	61
Tabela 5.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células do corpo lúteo jovem com expressão de CDC-47 dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo na fase de metaestro-diestro.....	61
Tabela 6.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo no corpo lúteo dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo nas fases de proestro-estro e metaestro-diestro.....	65
Tabela 7.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área com expressão de COX-2 nos corpos lúteos jovens e maduros da fase de metaestro-diestro dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.....	75

Capítulo 3

Tabela 1.	Anticorpos utilizados na placenta e ovário com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB).....	90
Tabela 2.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da dosagem plasmática de T4 livre dos grupos controle e hipotireóideo aos 0 e 19 dias de gestação.....	91
Tabela 3.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso e da porcentagem de epitélio folicular, lúmen e estroma da tireóide dos grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação.....	91
Tabela 4.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de fetos/fêmea, da taxa de mortalidade fetal e do peso dos fetos dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação	91
Tabela 5.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso do útero mais placenta aos 14 e 19 dias de gestação dos grupos controle e hipotireoideo.....	92
Tabela 6.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura das camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	93
Tabela 7.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de células trofoblásticas/campo nas camadas do disco placentário e da porcentagem de células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	93
Tabela 8.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área ocupada por sangue materno, trofoblasto/endotélio e capilar fetal na camada do	97

	labirinto placentário nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias e 19 dias de gestação.....	
Tabela 9.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 nas camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	101
Tabela 10.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área com expressão de VEGF nas camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	107
Tabela 11.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo nas camadas do disco placentário nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	107
Tabela 12.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso médio dos ovários e número médio de corpos lúteos/ovário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	108
Tabela 13.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 no corpo lúteo jovem dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	109
Tabela 14.	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo no corpo lúteo dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	109

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 1. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B, C e D) Folículo primordial, secundário (seta), terciário e atrésico, respectivamente. Expressão de CDC-47 nas células da granulosa e na camada da teca durante o desenvolvimento folicular. Redução acentuada da expressão de CDC-47 no folículo atrésico (D). As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo corado em marrom; A, Barra= 2,7 µm. C, Barra= 3,3 µm. B e D, Barra= 4 µm. 63
- Figura 2. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo, respectivamente. Redução acentuada do número de células marcadas por CDC-47 no corpo lúteo jovem do grupo hipotireóideo em relação ao controle. Grupo hipertireóideo semelhante ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo corado em marrom (seta); Barra= 2,9 µm. 63
- Figura 3. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Técnica de túnel, contra-coloração pelo *Metil green*. A) Marcação dos corpos apoptóticos na camada da granulosa em folículo terciário atrésico, Barra= 3,4 µm. B) Maior aumento da marcação dos corpos apoptóticos (seta) na camada da granulosa; Barra= 1,7 µm. Os corpos apoptóticos apresentam-se corados em marrom..... 67
- Figura 4. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Técnica de túnel, contra-coloração pelo *Metil green*. A, B e C) Grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo, respectivamente. Redução intensa do número de corpos apoptóticos (setas) no corpo lúteo do grupo hipotireóideo (B) em relação ao controle (A). Grupo hipertireóideo (C) com maior número de corpos apoptóticos no corpo lúteo em comparação ao controle (A). Os corpos apoptóticos apresentam-se corados em marrom; Barra= 5,4 µm..... 67
- Figura 5. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Folículos terciário e atrésico, respectivamente. Redução intensa da expressão de VEGF na camada da granulosa e da teca interna do folículo atrésico em relação ao folículo terciário. C e D) Corpo lúteo jovem e maduro, respectivamente. Corpo lúteo maduro com expressão de VEGF mais intensa nas células luteínicas do que o corpo lúteo jovem. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o núcleo e/ou o citoplasma corado em marrom. A, Barra= 4,2 µm. B, C e D, Barra= 3,4 µm..... 71
- Figura 6. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo, respectivamente. Aumento da intensidade de expressão do VEGF nas células luteínicas do corpo lúteo jovem do grupo hipotireóideo em relação ao controle. Grupo hipertireóideo semelhante ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 5,3 µm..... 71
- Figura 7. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A-E) Folículos em diferentes fases do desenvolvimento. Folículo primário (A), secundário (B), terciário inicial (C), terciário final (D) e atrésico (E). Menor expressão de Flk-1 na camada da granulosa dos folículos terciário final e atrésico (AT) em relação aos demais folículos. A, Barra= 2,3 µm. B, Barra= 3,9 µm. C, Barra= 8,7 µm. D e E, 73

	Barra= 7,5 μm	
Figura 8.	Ovário, rata, grupo controle, fase metaestro-diestro. A e B) Corpos lúteos jovem e em regressão, respectivamente. Corpo lúteo em regressão com expressão de Flk-1 nas células luteínicas mais intensa do que no corpo lúteo jovem. As células imunomarcadas pelo anticorpo Flk-1 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 3,6 μm	73
Figura 9.	Rata, grupo controle, ovário, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A) Visão panorâmica do ovário com expressão de COX-2 principalmente nos corpos lúteos e redução da expressão nos corpos lúteos em regressão (R) em relação ao corpo lúteo jovem (J); Barra= 87,6 μm . B) Expressão de COX-2 na camada da teca interna (seta); Barra= 1,5 μm . As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom.....	77
Figura 10.	Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóide e hipertireóide, respectivamente. Redução intensa da intensidade e da área de expressão de COX-2 no corpo lúteo jovem do grupo hipotireóide em relação ao controle. Grupo hipertireóide com redução da área de expressão de COX-2 em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 5,5 μm	77

Capítulo 3

Figura 1.	Útero (U) aberto de rata gestante (grupo controle) evidenciando-se discos placentários (P) ligados pelos cordões umbilicais (C) aos respectivos fetos (F) <i>in situ</i> . A - Âmnio.....	87
Figura 2.	Fetos de ratas com 19 dias de gestação. Fetos do grupo hipotireóide com o tamanho inferior ao do grupo controle.....	92
Figura 3.	Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. HE. A) Visão panorâmica do disco placentário com sinciotrofoblasto (S), espongiotrofoblasto (E), labirinto placentário (L), decídua (D) e útero (U); Barra= 31,4 μm . B) Detalhe das camadas do sinciotrofoblasto (S) e espongiotrofoblasto (E). Sinciotrofoblasto formado por células fundidas que compartilham o mesmo citoplasma, ora eosinofílico ora basofílico. Espongiotrofoblasto constituído por células bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com citoplasma escasso; Barra= 5 μm . C) Detalhe do labirinto placentário com finos capilares fetais (setas) sustentados por pequena quantidade de tecido conjuntivo e rodeados por células trofoblásticas alongadas ou ovóides (asterisco); Barra= 3,4 μm	95
Figura 4.	Disco placentário, rata, 14 dias de gestação. HE. A e B) Grupos controle e hipotireóide, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto (E) mais delgada no grupo hipotireóide; Barra=16 μm	95
Figura 5.	Espongiotrofoblasto, rata, 19 dias de gestação, HE. A e B) Grupos controle e hipotireóide, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto com maior quantidade de células de glicogênio (G) em relação às citotrofoblásticas (C) no grupo hipotireóide; Barra= 6,4 μm	99
Figura 6.	Labirinto placentário, rata, 19 dias de gestação, HE. A e B) Grupos controle e hipotireóide, respectivamente. Labirinto placentário com dilatação do seio vascular materno (M) no grupo hipotireóide; Barra=3,2 μm	99
Figura 7.	Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. Estreptavidina-	103

	biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. Expressão imunistoquímica de CDC-47 nas três camadas do disco placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom (seta); Barra= 3,6 µm.....	
Figura 8.	Disco placentário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Sinciotrofoblasto dos grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. C e D) Espongiotrofoblasto dos grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Menor expressão de CDC-47 nas células gigantes trofoblásticas (CG) e nos espongiotrofoblastos (EP) do grupo hipotireóideo em relação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom (seta); Barra= 3,2 µm.....	103
Figura 9.	Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. Expressão imunistoquímica de VEGF nas três camadas do disco placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 4,3 µm.....	105
Figura 10.	Labirinto placentário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Menor área de expressão de VEGF no labirinto placentário do grupo hipotireóideo em relação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 2 µm.....	105
Figura 11.	Ovário, rata. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias de gestação, respectivamente. C e D) Grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação, respectivamente. Expressão semelhante, homogênea e acentuada de VEGF nas células luteínicas do grupo controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação, sem diferença entre grupos. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 2 µm.....	111
Figura 12.	Ovário, rata. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias de gestação, respectivamente. Expressão intensa de Flk-1 nas células endoteliais e dos pericitos (seta) no grupo controle e hipotireóideo, sem diferença entre grupos. C e D) Grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação, respectivamente. Menor expressão de Flk-1 nas células luteínicas (asterisco) do grupo hipotireóideo em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo Flk-1 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 2 µm.....	113
Figura 13.	Ovário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Expressão de COX-2 nas células luteínicas (asterisco) do grupo hipotireóideo ausente em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 2 µm.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ADM - adrenomedulina
Agnor - regiões organizadoras de nucléolo argentaínas
AMPc – monofosfato de adenosina cíclico
Ang-1- angiopoetina 1
Ang-2 - angiopoetina 2
Ang-3 - angiopoetina 3
Ang-4 - angiopoetina 4
Angs – angiopoetinas
ANOVA - análise de variância
AP-2y - proteína gama 2 ativada
BAD – promotor de morte associado ao Bcl- XL /Bcl-2
Bax – proteína x associado ao Bcl-2
Bcl-2 - B cell leukaemia-2
Bcl-xL - B cell leukaemia-x long
Bcl-xs - B cell leukaemia-x short
Bid - A BH3 domain-only death agonist protein
Bok - Bcl-2 -related ovarian killer
CAD - DNase ativada pela caspase
Caspase – proteases de cisteína com especificidade de aspartato
CD44- Cluster of Differentiation 44
CDC-47 – proteína 47 de controle de divisão celular
Cdx-2 - gene Cdx-2 homeobox
CO₂ – dióxido de carbono
COX-1 – cicloxigenase 1
COX-2 – cicloxigenase-2
CRH - hormônio liberador de corticotropina
DAB – diaminobenzidina
DNA – ácido desoxirribonucleico
DNase - desoxirribonuclease
ECA - enzima conversora de angiotensina
EGF - fator de crescimento epidermal
EG-VEGF - fator de crescimento endotelial vascular de glândulas endócrinas
Eomes - gene T-box Eomesodermina
EP1 – receptor 1 de prostaglandina
EP2 - receptor 2 de prostaglandina
EP3 - receptor 3 de prostaglandina
EP4 - receptor 4 de prostaglandina
ERVs - retrovírus endógenos
ET-1 - endotelina-1
ETs-2 – fator de transcrição homólogo ao vírus oncogenico celular E26-AMV
FasL - Fas ligand
Fas – receptor 6 da superfamília do TNF
FGF - fator de crescimento fibroblástico
FGF-1 – fator de crescimento fibroblástico 1
FGF10 - fator de crescimento fibroblástico 10
FGF-2 - fator de crescimento fibroblástico 2
FGF4 - fator de crescimento fibroblástico 4
FGF7 - fator de crescimento fibroblástico 7
FGFb – fator de crescimento fibroblástico básico
FGFR-2 – receptor do fator de crescimento fibroblástico 2

Flk-1/KDR - kinase insert domain containing receptor
 Flt1 - Fms like tyrosine kinase receptor 1
 FSH – Hormônio folículo estimulante
 GDF-9 - fator de diferenciação e crescimento 9
 GH - hormônio do crescimento
 GMPc – monofosfato de guanosina cíclico
 GnRH – hormônio liberador de gonadotropina
 Hand1 - Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1
 hCG - gonadotropina coriônica humana
 HGF - fator de crescimento de hepatócitos
 HIF-1 - fator induzido por hipóxia 1
 Hoxa-10 - fator de transcrição homeobox 10
 HPT - eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano
 IAPs - proteínas inibidoras da apoptose
 IFND - interferon delta
 IFNs – interferons
 IFNT - interferon tau
 IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1
 IGF-2 - Fator de crescimento semelhante à insulina 2
 IGFBP1 - proteína-1 ligante do fator de crescimento semelhante a insulina
 IGFBP-2 - proteína-2 ligante do fator de crescimento semelhante a insulina
 IGFBP-3 - proteína-3 ligante do fator de crescimento semelhante a insulina
 IGFBP-4 - proteína-4 ligante do fator de crescimento semelhante a insulina
 IGFBP-5 - proteína-5 ligante do fator de crescimento semelhante a insulina
 IGFs - fatores de crescimento semelhante a insulina
 IgG – imunoglobulina G
 IL-1 - interleucina-1
 IL-8 - interleucina-8
 KGF - fator de crescimento de queratinócitos
 LH – Hormônio luteinizante
 LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante
 LIF - fator inibitório da leucemia
 LTH - hormônio luteotrópico
 Mash2 - mammalian achaete-scute homologue 2
 Mcl- Myeloid cell leukemia 1
 MHC-1 - complexo principal de histocompatibilidade de Classe 1
 NO - óxido nítrico
 Oct-4 - Octamer-binding transcription factor 2
 PAS - ácido periódico-Schiff
 PAs - Ativadores de plasminogênio
 PBS – solução fosfato tamponada
 PCDH12 - protocaderina 12
 PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen
 PGE2 - prostaglandina E2
 PGF2 α - prostaglandina F2 alfa
 PGH2 - prostaglandina intermediária instável
 PGI - prostaciclina
 PIGF – fator de crescimento placentário
 Pitx-2 - Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 2
 PK-1 - prokineticin 1
 PLP-A - proteína A semelhante à prolactina
 pO₂ – pressão de oxigênio
 PRL - prolactina adenohipofisária
 PrP - proteína relacionada à Proliferin (Plfr)

PTU - 6-propyl-2-thiouracil
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
rT3 - T3 reverso
sFlt-1 soluble Fms like tyrosine kinase receptor 1
SHBG - globulina ligadora de hormônio sexual
SNK - *Student Newman Keuls*
SSP1 - fosfoproteína-1 secretada
T3 – triiodotironina
T4 – tiroxina
TBG – tireoglobulina
TBS – solução de Tris tamponado
TdT - Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF- α - fator de crescimento transformante α
TGF- β – fator de crescimento transformante β
Tie2 – receptor tirosina quinase 2
TRH - hormônio liberador da tireotropina
TR α 1 – receptor tireoidiano α 1
TR β 1 – receptor tireoidiano β 1
TR β 2 – receptor tireoidiano β 2
TR β 3 – receptor tireoidiano β 3
TSH - hormônio estimulador da tireóide
TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick and labeling
TTR – transtirretina
TX - tromboxanos
uNKs - células “*natural killer*” uterinas
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3

RESUMO

Foram realizados dois experimentos distintos. No experimento 1, foi avaliado o efeito do hipo e do hipertireoidismo na atividade proliferativa, apoptótica, angiogênica e na expressão da COX-2 no ovário de ratas não gestantes. No experimento 2, avaliou-se o desenvolvimento placentário e fetal e a atividade luteal de ratas com hipotireoidismo. No experimento 1, 60 ratas Wistar adultas foram distribuídas de forma igualitária nos grupos hipotireóideo, hipertireóideo e eutireóideo (controle) nas fases de proestro-estro e metaestro-diestro. Foi avaliada a expressão imunoistoquímica de CDC-47, VEGF, Flk-1 e de COX2 e a apoptose pela técnica de túnel nos corpos lúteos e folículos ovarianos. No experimento 2, 36 ratas Wistar adultas foram distribuídas de forma igualitária nos grupos controle e hipotireóideo. Foram determinados o número e o peso dos fetos e a taxa de morte fetal, assim como as características morfométricas, a expressão imunoistoquímica de CDC-47 e de VEGF e o número de corpos apoptóticos no disco placentário. Nos ovários das ratas gestantes foram avaliados o número de corpos lúteos, a expressão de CDC-47, COX-2, VEGF e de Flk-1 e a apoptose. O hipo e o hipertireoidismo foram induzidos pela administração oral e diária de propiltiouracil (1 mg/animal) e de L-tiroxina (50 µg/animal), respectivamente. No experimento 1, as disfunções tireoidianas foram induzidas por três meses e no segundo experimento, a administração da droga começou cinco dias antes da cópula e terminou aos 19 dias de gestação. Os animais foram sacrificados aos 14 e 19 dias de gestação. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK ou T de Student. No experimento 1, concluiu-se que as disfunções tireoidianas alteram de forma diferenciada as atividades proliferativa, apoptótica e angiogênica e a expressão de COX-2 em corpos lúteos. Concluiu-se no experimento 2 que o hipotireoidismo afeta o desenvolvimento placentário e fetal por alterar as atividades proliferativa, apoptótica e angiogênica do disco placentário e altera também a atividade luteínica ovariana.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, hipertireoidismo, ovário, placenta, proliferação, apoptose, angiogênese, rata

ABSTRACT

Two different experiments were performed. In experiment 1, the effect of hypo- and hyperthyroidism on the proliferative activity, apoptotic, angiogenic and COX-2 expression in the ovary of non-pregnant rats was evaluated. In experiment 2, placental and fetal development and luteal activity in hypothyroid rats was evaluated. In experiment 1, 60 adult female Wistar rats were distributed equally in groups hypothyroid, hyperthyroid and euthyroid (control) in the stages of proestrus-estrus and metestrus-diestrus. The immunohistochemical expression of CDC-47, VEGF, Flk-1 and COX2 and apoptosis by TUNEL assay in ovarian follicles and corpora lutea were evaluated. In experiment 2, 36 adult female Wistar rats were distributed equally in control and hypothyroid groups. The number and weight of fetuses and the rate of fetal death was determined, as well as the morphometric characteristics, the immunohistochemical expression of CDC-47 and VEGF and the number of apoptotic cells in the placental disk. In the ovaries of pregnant rats were evaluated the number of corpora lutea, the expression of CDC-47, COX-2, VEGF and Flk-1 and apoptosis by TUNEL assay. The hypo- and hyperthyroidism were induced by daily oral administration of propylthiouracil (1 mg / animal) and L-thyroxine (50 mg / animal), respectively. In experiment 1, thyroid dysfunction were induced for three months and in the second experiment, the drug began five days before mating and ended at 19 days gestation. The animals were sacrificed at 14 and 19 days of gestation. The data were submitted to ANOVA and means were compared by Student's t or SNK. In experiment 1, it is concluded that thyroid dysfunctions differentially affect the levels of proliferative activity, angiogenesis and apoptosis and the expression of COX-2 in the ovaries of female rats, and these effects are dependent of the phase of the estrous cycle. We conclude in experiment 2 that hypothyroidism affects placental and fetal development by altering the proliferative activity, apoptotic, and angiogenic placental disc and also alters ovarian luteal activity.

Keywords: hypothyroidism, hyperthyroidism, ovary, placenta, proliferation, apoptosis, angiogenesis, rat

INTRODUÇÃO

No sistema genital feminino, particularmente no ovário e na placenta, vários processos celulares que incluem proliferação, diferenciação e migração celular, apoptose e angiogênese são essenciais para a função desses órgãos (Simpson *et al.*, 2001; Cross, 2005). Como o desenvolvimento ovariano e placentário é dependente da complexa interação entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, as disfunções tireoidianas comprometem a fertilidade (Choksi *et al.*, 2003), mas por muitos mecanismos que ainda não foram elucidados.

A tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) agem no tecido ovariano e placentário modulando seu metabolismo e desenvolvimento (Galton *et al.*, 2001; James *et al.*, 2007). Receptores específicos para T3 estão presentes no núcleo das células ovarianas, de modo que esse hormônio pode ter efeito direto sobre esses tecidos (Evans *et al.*, 1983; Mukku *et al.*, 1983; Mauro *et al.*, 1992). Já a placenta, além de expressar receptores para os hormônios tireoidianos (Leonard *et al.*, 2001), acumula e metaboliza a T3 e a T4 materna (Calvo *et al.*, 1992). Assim, as disfunções da tireóide, representadas pelo hipo e hipertireoidismo, estão associadas a várias alterações morfofuncionais ovarianas e placentárias com comprometimento da eficiência reprodutiva (Choksi *et al.*, 2003).

A prevalência de hipotireoidismo nas mulheres em idade reprodutiva e durante a gestação é de aproximadamente 0,3 a 2,5% (Idris *et al.*, 2005). Sua incidência está associada ao atraso do início da puberdade (Styne, 1991), anovulação, amenorréia ou hipermenorréia (Poppe e Glinöer, 2003), cistos ovarianos, irregularidade menstrual, infertilidade e aumento da frequência de abortos espontâneos (Longcope, 1991) e do nascimento de neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (Krassas, 2000). Em espécies animais como caprinos,

caninos e equinos, o hipotireoidismo tem sido apontado como uma das endocrinopatias mais frequentes e que também cursa com distúrbios reprodutivos (Piosik *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2002). Assim como em outras espécies animais, em ratas, a hipofunção tireoidiana inibe a foliculogênese e reduz a taxa de ovulação (Oliveira *et al.*, 2005), altera a morfologia uterina (Inuwa e Williams, 1996; Silva *et al.*, 2004) e desregula o ciclo estral (Hatsuta *et al.* 2004). Mas os mecanismos intra-ovarianos pelos quais o hipotireoidismo reduz a ovulação, aumenta a atresia folicular e prolonga a fase lútea ainda não são conhecidos.

Com relação ao hipertireoidismo, sabe-se que ratas hipertireóideas apresentam aumento da taxa de ovulação, redução da atresia folicular (Serakides *et al.*, 2001) e redução do ciclo estral (Choksi *et al.*, 2003), mas os mecanismos envolvidos nesses processos também não foram elucidados.

Em cada fase do desenvolvimento folicular ovariano, vários fatores intra e extracelulares de origem endócrina ou parácrina atuam direta ou indiretamente nos células foliculares a fim de orientar sua diferenciação, seja para o crescimento folicular ou para atresia. Assim, durante esse desenvolvimento e em cada fase específica do ciclo hormonal, ocorrem várias alterações qualitativas e quantitativas na microcirculação do ovário como também na sua atividade proliferativa e apoptótica (Plendl, 2000), sendo esses eventos importantes para a função lútea e folicular (Reynolds *et al.*, 2002). Conhecer os mecanismos pelos quais o hipotireoidismo inibe a função ovariana e o hipertireoidismo incrementa a foliculogênese e a ovulação também tem o objetivo de verificar se a utilização dos hormônios tireoidianos poderia ser uma prática viável para aumentar a eficiência reprodutiva, ou em caso contrário, utilizar as vias que intermedeiam a ação desses hormônios sobre a função

ovariana, para tentar aumentar o desempenho reprodutivo, particularmente nas espécies animais de produção.

Acredita-se que as implicações clínicas do quadro de hipotireoidismo na infertilidade da mulher seja resultado principalmente da interferência direta com a função ovariana normal (Wakim *et al.*, 1993). No entanto, alguns estudos demonstraram que o hipotireoidismo afeta diretamente a taxa de concepção por prejudicar a decidualização durante a implantação (Galton *et al.*, 2001), por alterar a reserva de glicogênio placentário (Shafrir *et al.*, 1994) e por afetar a expressão de *c-fos* e *c-jun* em ratas gestantes hipotireóideas, genes que estão associados com a diferenciação (Morrish *et al.*, 1997) e proliferação trofoblástica (Leonard *et al.*, 1999), respectivamente. Mas, até o momento, são poucos os estudos que avaliaram o papel da placenta na dificuldade de concepção e de manutenção da gestação advindas do hipotireoidismo (Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 1999).

A angiogênese placentária é de fundamental importância para garantir o fluxo de sangue e fornecer os substratos que dão suporte ao desenvolvimento fetal (Reynolds *et al.*, 2010), mas não se sabe qual seria o efeito da hipofunção tireoidiana sobre a angiogênese placentária. Além disso, durante o crescimento vascular, ocorre ampla reorganização tecidual entre a placenta e o endométrio, de modo que o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular desempenha papel crucial para a implantação do embrião e manutenção da gestação (Correia-da-Silva *et al.*, 2004). Ao contrário do hipertireoidismo (Freitas *et al.*, 2007), não há estudos sobre a atividade proliferativa e apoptótica da placenta de indivíduos com hipotireoidismo.

OBJETIVOS

- Estudar o efeito do hipo e do hipertireoidismo na expressão imunoistoquímica de VEGF, Flk1, CDC-47 e COX-2 e na taxa apoptótica pela técnica de túnel em ovários de ratas não gestantes (Capítulo 2).
- Verificar se o efeito do hipo ou hipertireoidismo sob a expressão de VEGF, Flk1, CDC-47 e COX-2 e sobre a taxa apoptótica varia de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular e luteínico e com a fase do ciclo estral (Capítulo 2).
- Avaliar o desenvolvimento fetal e estudar as alterações histomorfométricas do útero e da placenta de ratas com hipotireoidismo aos 14 e 19 dias de gestação, verificando também, a expressão imunoistoquímica de VEGF e CDC-47 e a taxa apoptótica, pela técnica de túnel, das células trofoblásticas (Capítulo 3).
- Estudar a expressão imunoistoquímica de VEGF, Flk1, CDC-47 e COX-2 e a taxa apoptótica pela técnica de túnel no corpo lúteo de ratas gestantes com hipotireoidismo (Capítulo 3).

CAPITULO 1

Revisão de literatura

1. Foliculogênese, vascularização e angiogênese ovariana

A foliculogênese ovariana que envolve o desenvolvimento dos folículos primordial, primário, secundário e terciário ou de Graaf e do corpo lúteo é acompanhada por alterações qualitativas e quantitativas da microcirculação (Plendl, 2000).

A artéria ovariana, proveniente da aorta abdominal, antes de entrar no hilo ovariano se divide em várias artérias tortuosas. Essas artérias penetram no hilo ovariano e percorrem até o centro medular do ovário. Essa região bem vascularizada é conhecida como zona vascular e contém grande quantidade de tecido conjuntivo. No córtex ovariano, conhecido como zona parenquimatosa, duas zonas distintas têm sido descritas: uma zona externa com vascularização escassa envolta pela túnica albugínea e uma zona interna, muito vascularizada que apresenta folículos e corpos lúteos. A densa camada de tecido conjuntivo da túnica albugínea fica entre o córtex e o epitélio germinativo não-vascular que envolve os ovários (Niswender e Nett, 1988).

Em todos os tecidos, inclusive ovariano, é necessário fluxo sanguíneo adequado para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, para a remoção de CO₂ e de outros subprodutos metabólicos e para a transferência de hormônios para as células-alvo (Robinson *et al.*, 2009). Durante o desenvolvimento embrionário, os vasos sanguíneos se formam a partir de precursores endoteliais por um processo denominado vasculogênese. Em adultos, o crescimento vascular se dá pela angiogênese que se caracteriza pela proliferação e migração de células

endoteliais a partir de vasos pré-existentes (Tamanini e Ambrogi, 2004).

No sistema genital feminino, particularmente no ovário, a angiogênese ocorre como um processo normal e crucial para a função lútea e folicular (Plendl *et al.*, 1996). E por isso, os mecanismos genéticos e moleculares que controlam a angiogênese durante o desenvolvimento folicular estão sendo elucidados (Shimizu e Sato, 2005).

Nos ovários, cada fase específica do ciclo hormonal é acompanhada por grandes mudanças vasculares (Plendl, 2000). Existem evidências de que a manutenção do leito vascular e a higidez da camada da teca do ovário estão intimamente relacionadas (Zeleznik *et al.*, 1981; Greenwald, 1989), sendo que a formação de uma rede vascular adequada é um fator limitante na seleção e na maturação do folículo dominante (Reynolds *et al.*, 2000; Stouffer *et al.*, 2001; Celik-Ozenci *et al.*, 2003). Além disso, a redução da vascularização na camada da teca pode representar, pelo menos em algumas espécies animais, um dos primeiros eventos que ocorre durante a atresia folicular (Greenwald, 1989).

Por ser o crescimento vascular um evento importante para a função folicular e lútea, distúrbios da angiogênese estão envolvidos na gênese de várias patologias ovarianas como dos cistos foliculares, da síndrome de hiperestimulação ovariana e das neoplasias malignas e benígnas (Reynolds *et al.*, 2002). Por isso, algumas pesquisas têm tentado elucidar os fatores e mecanismos que controlam a angiogênese no sistema genital com a finalidade de buscar novas abordagens para o tratamento de patologias e infertilidades tanto na mulher como nos animais domésticos (Fraser e Lunn, 2000).

Sob estímulo de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, os folículos e corpos lúteos sintetizam fatores que podem agir isoladamente ou em conjunto para regular a

angiogênese (Shimizu *et al.*, 2003). Os fatores anti-angiogênicos, bem como seus mecanismos de ação são pouco conhecidos. A endostatina e a angiostatina tem sido descritos como os principais fatores anti-angiogênicos que regulam a vascularização folicular e lútea (Tamanini e Ambrogi, 2004; Fraser e Duncan, 2009; Robinson *et al.*, 2009). No entanto, nos últimos anos, uma ampla variedade de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), as angiopoetinas e o fator de crescimento epidermal, dentre outros, tem sido amplamente descritos (Shibuya, 2008). Embora os mecanismos de ação dos fatores pró-angiogênicos sejam mais conhecidos em comparação ao dos fatores anti-angiogênicos, esses mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

1.1 Angiogênese folicular

Tanto os folículos primordiais como os primários recebem nutrientes e oxigênio por difusão passiva dos vasos sanguíneos do estroma ovariano, uma vez que não possuem uma rede vascular própria (Plendl, 2000). No entanto, em torno de cada folículo secundário há a formação de uma rede capilar para que ele se desenvolva (Shimizu *et al.*, 2003).

O folículo primário avança no estroma cortical, uma vez que aumenta de tamanho, principalmente pela proliferação das células da granulosa. Com a proliferação clonal rápida, a única camada de células da granulosa do folículo primário dá origem a um epitélio estratificado, a camada da granulosa, que não é vascularizado, caracterizando o folículo secundário. À medida que as células da granulosa se proliferam, as células do estroma que envolvem o folículo formam uma bainha de células do tecido conjuntivo conhecida como camada da teca. Essa camada se diferencia em duas camadas, a teca interna vascular, formada por células cuboidais secretoras, e a

teca externa, formada por células do tecido conjuntivo (Plendl, 2000). Toda essa dinâmica folicular que envolve a diferenciação do folículo primordial para folículo primário e este último para folículo secundário, é coordenada principalmente pela ação de fatores de crescimento sistêmicos como o hormônio do crescimento e os hormônios tireoidianos, e fatores intrafoliculares, como os fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs), membros da superfamília de fatores de crescimento de transformação β e α (TGF- β e TGF- α), fatores de crescimento fibroblástico (FGFs), citocinas, entre outros (Webb e Armstrong, 1998).

Quando a camada granulosa do folículo secundário apresenta de 6 a 12 camadas, extensas “*gap junctions*” se formam e fendas repletas de líquido folicular se desenvolvem entre as células, originando o antro folicular que caracteriza o folículo terciário (Plendl, 2000). À medida que o antro folicular se desenvolve, a camada da teca adquire uma bainha vascular constituída por duas redes capilares localizadas na teca interna e externa. A aquisição de uma rede vascular adequada é um passo limitante para a seleção e maturação do folículo dominante destinado a ovular (Stouffer *et al.*, 2001). Para que os folículos progridam para o estágio antral, a granulosa e a teca devem desenvolver receptores para as gonadotropinas, sendo que os receptores para FSH e LH se desenvolverão na camada da granulosa e da teca, respectivamente (Cunningham, 2004).

A ausência de *tight junctions* entre as células da camada granulosa indica que não há nenhuma barreira hemato-folicular. Pelo contrário, a circulação de nutrientes e macromoléculas de pequenos vasos sanguíneos localizados na teca interna para o antro folicular é essencial para o desenvolvimento do ovócito e do folículo. A membrana basal, que consiste em colágeno IV, fibronectina e laminina, forma uma

barreira dentro da parede folicular impedindo que vasos sanguíneos da teca invadam a camada da granulosa (Plendl, 2000).

O desenvolvimento do folículo pré-ovulatório está associado ao aumento do número de vasos sanguíneos na teca. A angiogênese inicia-se na teca de folículos médios de suínos (Shimizu *et al.*, 2002). Já em folículos de bovinos, o fluxo sanguíneo detectável cresce gradualmente a partir do ápice do folículo, seguido pela região equatorial ou basal da camada capilar da teca interna (Jiang *et al.*, 2003), que irá formar uma rede vascular rica ao redor da camada da granulosa (Shimizu *et al.*, 2003). Em suínos, bovinos e coelhos formam-se na teca interna três camadas vasculares, enquanto em ratas a teca interna permanece com uma camada única de capilares (Shimizu *et al.*, 2003).

A proximidade das células da granulosa e da teca permite a síntese cooperativa de estrógeno. A teca produz andrógenos (testosterona e androstenediona) sob influência do LH, o qual se difunde para a camada da granulosa, na qual os andrógenos são transformados em estrógeno. O estrógeno promove a formação de receptores adicionais para o FSH à medida que avança o desenvolvimento do folículo antral que se torna cada vez mais responsivo a este hormônio (Cunningham, 2004).

Em bovinos, o aumento do fluxo capilar ocorre paralelamente ao aumento dos níveis plasmáticos de estrógeno até a ovulação. No entanto, o estrógeno não parece exercer efeito sobre a angiogênese folicular (Acosta *et al.*, 2003). Surpreendentemente, cerca de 40% de todas as células que estão se proliferando na teca são de origem endotelial (Martelli *et al.*, 2009). Nestes folículos, a angiogênese é também acompanhada de vasodilatação, uma adaptação funcional à ovulação e iminente

para o desenvolvimento da função endócrina da teca (Jiang *et al.*, 2003).

O controle da angiogênese nessa fase depende da interação entre vários fatores de crescimento como o VEGF, o FGF e as angiopoetinas, que poderão agir em momentos diferentes, alguns estimulando o crescimento vascular e outros estimulando a organização das células endoteliais em estruturas vasculares mais complexas (Grasselli *et al.*, 2003).

A degeneração do endotélio capilar é um fator relevante na atresia folicular, uma vez que interrompe o fornecimento de metabólitos para as células foliculares. Embora a atresia seja um evento normal no ciclo ovariano, o número de folículos atrésicos em alguns quadros de infertilidade é maior, como no hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2004), na síndrome de Cushing, na hiperprolactinemia, na hiperplasia congênita da adrenal e nas neoplasias funcionais da hipófise ou da adrenal (Areia *et al.*, 2006). Além disso, o aumento da densidade vascular em torno dos folículos antrais contribui para a inibição da atresia (Shimizu *et al.*, 2003). Assim, interferir na expressão e na atividade dos fatores angiogênicos tem sido uma das metas para tentar reduzir a atresia folicular e aumentar a ovulação, a fim de melhorar o desempenho reprodutivo (Fraser e Duncan, 2009).

Na fase final do desenvolvimento do folículo antral, o FSH e os estrógenos iniciam a formação de receptores para LH na granulosa, enquanto os receptores para FSH começam a diminuir. O aumento da secreção de estrógeno pelo folículo pré-ovulatório finalmente resulta no início do pico pré-ovulatório de gonadotropinas. Assim, nos últimos estágios do desenvolvimento, o folículo fica progressivamente sob o controle do LH quando ele atinge o auge do seu crescimento final até o ponto de ocorrer a ovulação (Cunningham, 2004).

Após a onda de LH antes da ovulação, há vasodilatação capilar e aumento da rede vascular (Shimizu *et al.*, 2003). Há evidências de aumento da permeabilidade vascular, edema e isquemia tecidual após a onda de LH. Pouco antes da ovulação, o fluxo de sangue é interrompido no estigma ovariano, ocorrendo ruptura da membrana basal e de toda a parede folicular (Plendl, 2000).

Após a ruptura da parede folicular a camada da granulosa forma grandes projeções salientes no lúmen residual. O sangramento dos capilares da teca interna no lúmen folicular resulta na formação do corpo hemorrágico (Plendl, 2000). Células do tecido conjuntivo e células endoteliais da teca interna rapidamente migram para a camada granulosa, à medida que a camada da granulosa e as células da teca interna começam a luteinizar (O'Shea *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1994).

1.2 Angiogênese luteal

A principal função do corpo lúteo é a secreção de progesterona, que prepara o útero para o início e para a manutenção da gestação (Cunningham, 2004). A angiogênese luteal vai começar com a dissolução da membrana basal entre as camadas da teca interna e da granulosa. Depois disso, os capilares da teca interna se expandem em direção à camada granulosa avascular para formar uma densa rede de capilares que cercam as células da granulosa. A duração da fase de intensa angiogênese do corpo lúteo varia entre as espécies animais e é caracterizada pelo desenvolvimento de uma rede capilar de alta densidade, onde as células endoteliais microvasculares são as mais abundantes no corpo lúteo (Kaczmarek *et al.*, 2005). As células endoteliais compõem a maioria das células em divisão (cerca de 85%) na primeira fase lútea dos primatas (Stouffer *et al.*, 2001). A proliferação das células endoteliais no desenvolvimento do corpo

lúteo pode ser de 4 a 20 vezes mais intensa do que quando comparada a de tumores humanos mais malignos (Stouffer *et al.*, 2001).

As células da granulosa e da teca interna sofrem grandes mudanças morfológicas para se tornarem as células luteínicas maiores e menores, respectivamente (Niswender e Nett, 1988), e assim habilitar o corpo lúteo a funcionar como uma glândula endócrina transitória (Tamanini e Ambrogi, 2004).

Durante a maturação do leito vascular do corpo lúteo recém-formado, as células endoteliais das arteríolas e vênulas recrutam células musculares lisas para estabilizá-las e controlar a vasotonia. Já as células endoteliais de microvasos atraem os pericitos para os capilares, que irão controlar a função vascular (Stouffer *et al.*, 2001).

Três categorias diferentes de artérias podem distinguir-se no corpo lúteo maduro das espécies domésticas. As artérias da cápsula, que provém de uma artéria espiralada que rodeia o corpo lúteo e se dividem numa segunda categoria, as artérias septais, que percorrem os septos que determinam a estrutura lobular do corpo lúteo. E uma terceira categoria, representada pelas artérias parenquimatosas, que construirão a densa rede capilar do corpo lúteo (Könnig e Amselgruber, 1986).

Se a fecundação e a implantação do embrião não ocorrerem, o corpo lúteo sofre luteólise que se caracteriza por degeneração das células esteroidogênicas e endoteliais (Stouffer *et al.*, 2001). No entanto, as células endoteliais microvasculares são as primeiras a sofrer apoptose no início da regressão do corpo lúteo. Alguns capilares e microvasos maiores são mantidos e, provavelmente, eles desempenham papel importante na reabsorção do tecido luteal (Davis *et al.*, 2003). Todo esse processo será resultado da ação luteolítica da prostaglandina F_{2α}, tanto

de origem uterina quanto luteal (Cunningham, 2004).

Na regressão luteal em bovinos ao final da prenhez, podem ser encontradas numerosas anastomoses arteriovenosas. Essas anastomoses podem diminuir o fluxo sanguíneo e induzir degeneração inicial das células luteínicas (Reynolds e Redmer, 1998). O desprendimento das células endoteliais antes da apoptose, bem como a oclusão dos vasos sanguíneos por contração mioepitelial podem também ser fatores determinantes da regressão dos vasos sanguíneos durante a luteólise (Modlich *et al.*, 1996). Fatores derivados do endotélio, como as prostaglandinas e/ou as endostatinas, parecem controlar a vida funcional do corpo lúteo (Stouffer *et al.*, 2001). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que levam à regressão vascular durante a luteólise não são completamente conhecidos.

À medida que o corpo lúteo involui, uma cicatriz branca, o corpus albicans, é formado, pela proliferação de tecido conjuntivo por entre as células degeneradas. Sua vascularização é muito pequena quando comparada a do corpo lúteo funcional (Plendl, 2000).

1.3 Fatores ovarianos angiogênicos

Os folículos ovarianos e os corpos lúteos se desenvolvem simultaneamente com redes capilares que evoluem em estreita proximidade com as células foliculares e luteínicas. Múltiplas interações entre as células endoteliais e não endoteliais podem desempenhar papel importante na angiogênese ovariana (Plendl, 2000). A proliferação, migração e maturação vascular podem ser influenciadas positivamente ou negativamente por diversos fatores (Robinson *et al.*, 2009).

O significado de uma série de fatores pró e anti-angiogênicos no controle local da

atividade ovariana tem se tornado cada vez mais evidente. Pelo menos 20 fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos foram identificados até o momento. Os principais fatores pró-angiogênicos produzidos pelo folículo e corpo lúteo de vacas, porcas, ovelhas, éguas, ratas e na mulher são o VEGF, o FGF e as angiopoetinas (Robinson *et al.*, 2009). Eles têm muitas funções que se sobrepõem, mas existem algumas diferenças importantes. O bloqueio do VEGF destacou seu papel não só no controle da angiogênese como também na atividade ovariana. Por exemplo, a inibição da sinalização do VEGF pode interromper não só a ovulação, como também bloquear completamente a vascularização do corpo lúteo, caso o animal chegue a ovular, impedindo subsequente a ascensão pós-ovulatória da progesterona (Fraser e Lunn, 2001).

Sobre os fatores anti-angiogênicos, sabe-se que eles geralmente estão associados com a matriz extracelular e que suprimem a angiogênese ao inibir a migração endotelial ou por estimular a apoptose das células endoteliais (Armstrong e Bornstein, 2003).

1.3.1 Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs)

Os VEGFs e seus receptores têm sido encontrados nos ovários de várias espécies, incluindo bovinos, suínos, ovinos e macacos (Reynolds e Redmer, 1998). Eles são potentes mitógenos de células endoteliais além de aumentar a permeabilidade vascular (50.000 vezes superior à histamina) e de promover a manutenção estrutural de capilares e vênulas (Redmer *et al.*, 2001).

A família do VEGF é composta por pelo menos sete membros (VEGF A-E, PlGF e VEGF derivado do veneno de cobra), sendo que a primeira molécula identificada foi nomeada VEGF-A. Até recentemente, foi verificado que as proteínas VEGF exercem suas funções quase que exclusivamente por meio de uma família de receptores tirosina-

quinase denominados VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Stouffer *et al.*, 2001; Shibuya, 2008). O VEGFR-2 é expresso principalmente em células endoteliais e intermedeia os efeitos angiogênicos do VEGF sobre a proliferação e migração endotelial. Já o VEGFR-1 é considerado crítico para a formação de tubos capilares induzida pelo VEGF (Boonyaprakob *et al.*, 2003), sendo ele expresso em células endoteliais em proliferação e quiescentes (Berisha *et al.*, 2000). O VEGFR-3 é expresso por células endoteliais de linfáticos e regula a linfangiogênese (Shibuya, 2008).

A síntese de VEGF é controlada de forma distinta em cada folículo ovariano de acordo com o tamanho folicular. A expressão de RNAm de VEGF no ovário de primatas ocorre em células da teca de folículos antrais e nas células da granulosa mais próximas do ovócito no folículo pré-ovulatório, mas não ocorre nas células da granulosa de folículos primordiais e pré-antrais (Kaczmarek *et al.*, 2005). A ação permeabilizante do VEGF parece ser essencial na formação do antro durante o desenvolvimento folicular (Zimmermann *et al.*, 2003). Já em folículos de bovinos e suínos, a expressão de VEGF é fraca durante o desenvolvimento folicular ovariano inicial e torna-se mais intensa nas células da teca e da granulosa durante o desenvolvimento do folículo dominante (Kaczmarek *et al.*, 2005; Huñigen *et al.*, 2008). Os ovários de ratas apresentam semelhança ao de bovinos e suínos quanto à expressão de VEGF, mas alguns folículos secundários da rata também expressam VEGF na zona pelúcida, sugerindo que esse fator seja importante para a seleção de folículos dominantes (Celik-Ozenci *et al.*, 2003).

O VEGF também está envolvido na ovulação. A maior expressão de VEGF após a administração de uma dose ovulatória de gonadotropinas se correlaciona com o aumento dos níveis de prostaglandinas, que

já são conhecidas por terem papel na ovulação (Kaczmarek *et al.*, 2005). Um rápido aumento da permeabilidade vascular no momento da ovulação, atribuível à interação do VEGF com as prostaglandinas, pode favorecer o extravasamento de fluido para dentro do antro folicular e, com isso, aumentar a pressão intrafolicular, em resposta ao aumento das gonadotropinas. Além disso, o VEGF como estimulador de algumas enzimas proteolíticas e de ativadores do plasminogênio em células endoteliais pode enfraquecer estruturalmente a parede do folículo antes da sua ruptura (Kaczmarek *et al.*, 2005).

O VEGF é também essencial para a angiogênese do corpo lúteo. Ele está presente no tecido conjuntivo luteal, nas células luteais do parênquima e nas células perivasculares de arteríolas, particularmente em pericitos (Kaczmarek *et al.*, 2005). Na égua, as células luteais expressam RNAm de VEGF até o último quarto da fase lútea, quando a expressão diminui, exceto em células como macrófagos, provavelmente devido a hipóxia (Müller *et al.*, 2009).

De fato foi relatado que a hipóxia, ao invés das gonadotropinas, é o principal regulador da expressão de VEGF em culturas primárias de células luteais de primatas e de mulheres (Duncan *et al.*, 2008). O papel das gonadotropinas e da hipóxia no controle da expressão do VEGF ovariano, no entanto, ainda não está claro. Onde o VEGF é regulado pela hipóxia, há aumento da regulação de fatores específicos de transcrição como o fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), que é translocado do citoplasma para o núcleo (Kaczmarek *et al.*, 2005). No ovário normal, o HIF-1 nuclear é raro nos folículos em crescimento e também nos folículos dominantes pré-ovulatórios, mas aumenta consideravelmente durante a ovulação (Duncan *et al.*, 2008), embora, paradoxalmente, haja uma diminuição da expressão do VEGF (Taylor *et al.*, 2004). No suíno, a produção de VEGF pode

aumentar significativamente pela hipóxia causada pela redução gradual da pressão de O₂ (pO₂) no fluido folicular durante a maturação folicular (Bianco *et al.*, 2003). Em bovinos, a exposição *in vitro* a uma baixa pO₂ pode estimular a expressão de RNAm de VEGF. Ao contrário, a hipóxia não exerce efeito sobre a expressão do VEGF em células da granulosa de primatas (Martinez-Chequer *et al.*, 2003).

O VEGF suprime a apoptose das células endoteliais vasculares porque controla as proteínas da família Bcl-2 (Kaczmarek *et al.*, 2005). Já a inibição local da atividade do VEGF-A promove aumento da apoptose das células foliculares por desencadear um desequilíbrio entre os membros da família Bcl-2 (Abramovich *et al.*, 2006). Também foi constatado que o VEGF suprime a apoptose em cultura de células da granulosa de bovinos por inibir a liberação da DNase ativada pela caspase, sem estar associada com a via mitocondrial e sem estimular a Bcl-xL ou inibir o gene Bax, que relacionam-se com a apoptose (Kosaka *et al.*, 2007).

1.3.2 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

Os FGFs são uma família de polipeptídeos com ação pró-angiogênica potente e que são expressos em folículos maduros e no corpo lúteo, com pequenas variações durante o ciclo ovariano. O FGF-1 e o FGF-2 estimulam a proliferação de vários tipos celulares, mas também agem diretamente nas células endoteliais estimulando sua proliferação e migração (Plendl, 2000; Stouffer *et al.*, 2001). Além disso, exercem efeito anti-apoptótico em cultura de células da granulosa de ovários de suínos ao favorecer a produção de fatores angiogênicos como o VEGF (Shimizu *et al.*, 2003).

O FGF-2 foi extraído e identificado a partir do corpo lúteo de bovino (Gospodarowicz,

1990). Esse fator é um forte mitógeno para as células endoteliais e pode ser produzido por células da granulosa e por corpos lúteos de bovinos, ovinos e suínos. O FGF-2 estimula a proliferação de células endoteliais luteais *in vitro* e modula o efeito angiogênico do VEGF no corpo lúteo (Pepper *et al.*, 1998).

Como não são uma proteína secretória clássica, os FGFs podem atuar como fatores de auto-estimulação para o crescimento capilar. Um dado importante é que os FGFs podem influenciar não só a proliferação celular lútea, mas também a morte celular. Receptores para o FGF-1 são expressos em células endoteliais em todos os estágios do ciclo ovariano, mas principalmente nas células endoteliais dos vasos maiores no final do ciclo estral. Da mesma forma, a expressão do receptor do FGF-2 (FGFR-2) é encontrada nos vasos apenas no final do ciclo. Essas observações levaram à hipótese de que os FGFs também podem controlar a regressão luteal das células endoteliais (Redmer e Reynolds, 1996). Associado a esse conhecimento, verificou-se que o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) pode estar envolvido na indução da luteólise, uma vez que estimula a secreção de prostaglandinas em células luteais de bovinos (Neuvians *et al.*, 2004).

1.3.3 Angiopoetinas (Angs)

As Angiopoetinas são glicoproteínas expressas principalmente pelas células endoteliais (Maisonpierre *et al.*, 1997). No camundongo três tipos de Angs foram identificadas, Ang-1, Ang-2 e Ang-3, enquanto que em humanos, uma Ang-4 também foi identificada (Stouffer *et al.*, 2001). As Angs se ligam a receptores tirosina-quinase, Tie1 e Tie2, que são diferentes dos receptores para o VEGF (Maisonpierre *et al.*, 1997).

Estudos com deleção gênica têm demonstrado que a atividade da Tie2 é

essencial para o recrutamento das células do estroma que estabilizam a estrutura vascular, para o intercâmbio do fluido capilar e para a resistência vascular ao estresse hemodinâmico (Stouffer *et al.*, 2001). A Ang-2 desestabiliza os vasos existentes para que fatores angiogênicos como o VEGF possam estimular a proliferação e a migração das células endoteliais. Já a Ang-1 recruta pericitos para dar suporte às células endoteliais e com isso promove a maturação e mantém a integridade da rede vascular (Stouffer *et al.*, 2001). A Ang-1 é amplamente expressa em todos os tecidos, enquanto que a Ang-2 é expressa principalmente no ovário, no útero e na placenta (Stouffer *et al.*, 2001). A expressão do RNAm de Ang-2 é reduzida em folículos maduros (Hayashi *et al.*, 2003). A expressão de Ang-1 em culturas de células da teca de bovinos é suprimida pela hipóxia, enquanto a expressão de Ang-2 é estimulada por essa condição. Em folículos em atresia inicial, a razão Ang-2/Ang-1 aumenta enquanto a expressão do RNAm de Tie2 diminui, indicando uma instabilidade progressiva dos vasos sanguíneos (Hayashi *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2009).

1.3.4 Fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs)

Os IGFs (IGF-1 e IGF-2) são fatores de crescimento que propiciam o crescimento e as atividades metabólicas promovidas pela insulina (Nicosia e Villaschi, 1999).

O IGF-1 é expresso em células luteínicas e endoteliais (Schams *et al.*, 1999) e pode induzir mitose e melhorar a esteroidogênese das células da granulosa e da teca de ovários de bovinos (Spicer *et al.*, 1996). O IGF-2 localiza-se em pericitos do corpo lúteo de bovinos (Amselgruber *et al.*, 1994) e especula-se que ele possa afetar de forma autócrina a proliferação e a diferenciação dos pericitos e atuar como um fator de crescimento local importante para a

angiogênese luteal (Amselgruber *et al.*, 1994).

No corpo lúteo da rata, as células endoteliais expressam altas concentrações de proteína-3 ligante de IGF durante a luteólise. Por conseguinte, foi sugerido que esta proteína desempenha papel importante durante a apoptose das células endoteliais (Erickson *et al.*, 1993). Mas o papel dessa proteína ainda não está totalmente esclarecido. Ao contrário da rata, nos ovinos, a expressão do RNAm da proteína-3 ocorre durante toda a fase lútea demonstrando que, provavelmente, essa proteína possa controlar a angiogênese e a função lútea ao invés da apoptose das células endoteliais (Perks e Wathes, 1996).

1.3.5 Outros potenciais fatores angiogênicos

As citocinas intra-ovarianas podem atuar como potenciais fatores angiogênicos durante o ciclo estral (Gaetje, 1994). A interleucina-8 (IL-8), que é um fator de ativação de neutrófilos, é também um agente angiogênico potente modulado por hormônios esteróides e pelo hormônio do crescimento. Essa citocina pode desempenhar papel importante na ovulação e especialmente na neovascularização do corpo lúteo (Arici *et al.*, 1996).

Já o fator de crescimento endotelial vascular de glândulas endócrinas (EG-VEGF) é um novo mitógeno com ação angiogênica seletiva para células endoteliais das glândulas endócrinas (LeCouter *et al.*, 2001). Ele é idêntico a uma proteína previamente clonada denominada prokineticin 1 (PK-1). Em humanos, as células da granulosa expressam RNAm de EG-VEGF/PK-1 (Kisliouk *et al.*, 2003). A expressão dessa proteína é reduzida pela hipóxia que, ao contrário, estimula ativamente a expressão de VEGF (Kisliouk *et al.*, 2003), como descrito anteriormente.

O óxido nítrico (NO) é primariamente um produto endotelial que atua como vasodilatador local e que pode estimular a produção de VEGF e a angiogênese (Reynolds *et al.*, 2002). Ele é sintetizado pelas células da teca e luteínicas de folículos ovarianos. Sua produção é variável durante o crescimento folicular e seu aumento resulta na síntese de receptores para VEGF nas células da granulosa (Shimizu *et al.*, 2002).

O fator de crescimento epidermal (EGF) é um fator angiogênico que tem sido detectado em células do *cumulus oophorus* da granulosa, da teca e intersticiais do ovário. O EGF inibe a apoptose e estimula a síntese de fatores angiogênicos pelas células da granulosa, além de estimular a proliferação dessas células (Shimizu *et al.*, 2002).

Ativadores de plasminogênio (PAs) são responsáveis pela ativação do plasminogênio em plasmina, que está ativa na cicatrização de feridas, inflamação, na implantação do embrião, na invasão tumoral e metástases, na ovulação, bem como na angiogênese (Liu *et al.*, 2003). Seu papel no desenvolvimento do corpo lúteo tem sido estudado em várias espécies e, em especial, nos primatas (Liu *et al.*, 2003).

A angiotensina II é um peptídeo vasoativo, convertido a partir da angiotensina I pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Ela regula a maturação de ovócitos, a ovulação e a esteroidogênese. No corpo lúteo de bovinos, as células endoteliais possuem receptores para a angiotensina II e podem converter a angiotensina I em II (Kobayashi *et al.*, 2001), que estimula a angiogênese (Kobayashi *et al.*, 2002).

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo de 21 aminoácidos encontrado no endotélio (Kobayashi *et al.*, 2001) e que promove a proliferação das células endoteliais (Davis *et al.*, 2003). Acosta *et al.* (2003) verificaram que a infusão de LH em folículos maduros

isolados de bovinos aumentou a liberação de ET-1 pelas células da teca interna.

2. Atividade ovariana proliferativa e apoptótica

Em cada fase do desenvolvimento folicular, vários fatores extracelulares de origem endócrina ou parácrina, como também alguns fatores intracelulares, atuam direta ou indiretamente nas células foliculares no sentido de orientar sua diferenciação, seja para o crescimento folicular ou atresia. Assim, o controle da atividade proliferativa e apoptótica no tecido ovariano é um processo complexo que envolve o equilíbrio entre diversas moléculas regulatórias e que podem ser alteradas por numerosos sinais externos (Salveti *et al.*, 2009).

Mais de 99,9% dos folículos ovarianos presentes ao nascimento não ovulam. O destino mais comum deles é a atresia, a qual é mediada por um tipo altamente organizado de morte celular conhecido como apoptose ou morte celular programada (Markström *et al.*, 2002). A apoptose é um processo fisiológico essencial para o desenvolvimento embrionário normal e para a homeostase dos tecidos adultos, sendo que sua ocorrência varia de acordo com o metabolismo do tecido. No ovário, a apoptose tem sido associada a uma gama de processos relacionados com o desenvolvimento normal que incluem a morte do ovócito, das células da granulosa e do epitélio ovariano como também a luteólise (Markström *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2008). Acredita-se que a alta taxa de apoptose das células foliculares seja a causa da senescência reprodutiva, uma vez que não há renovação constante dos ovócitos por células tronco (Kaipia e Hsueh, 1997). Mas há pesquisas que demonstraram a presença de células tronco germinativas no tecido ovariano, durante a fase adulta, dando origem a ovócitos (Johnson *et al.*, 2004; Eggan *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2009).

Assim, o desenvolvimento folicular, que se caracteriza por altas taxas de proliferação e apoptose, vai depender da presença de fatores de sobrevivência que promovem o crescimento do folículo e protegem as células da apoptose. Na ausência de fatores de sobrevivência, as vias de apoptose endógenas dentro do folículo tornam-se ativas e levam a atresia folicular (Quirk *et al.*, 2004). No entanto, a diferença no número de folículos que diminuem em cada fase do desenvolvimento indica que o controle da sobrevivência ou da atresia folicular não é a mesma em cada fase (Markström *et al.*, 2002).

Acredita-se que em folículos primordiais a apoptose oocitária seja responsável pela degeneração folicular subsequente, sendo que durante a morte do ovócito, apoptose e autofagia ocorrem simultaneamente (Markström *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2008). Tem sido relatado que a interação do c-Kit ligante é importante para a sobrevivência de folículos primordiais durante o período fetal como também no período pós-natal. Além disso, outro fator derivado dos ovócitos que é importante para a sobrevivência de pequenos folículos é o fator de diferenciação e crescimento 9 (GDF-9), uma vez que folículos de camundongo com deleção gênica para o GDF-9 não desenvolvem até o estágio primário ou secundário inicial (Dong *et al.*, 1996; Markström *et al.*, 2002). Também foi verificado por Orisaka *et al.* (2006) que o GDF-9 promove a sobrevivência e o crescimento folicular durante a transição do estágio pré-antral para o antral por reprimir a apoptose das células da granulosa e a atresia folicular.

Pouco se conhece sobre o controle da sobrevivência de folículos pré-antrais. Fatores de sobrevivência produzidos localmente pelos folículos pré-antrais, que incluem o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e o fator de crescimento fibroblástico (FGF), suprimem

a apoptose e promovem *in vitro* o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais (McGee *et al.*, 1999). A síntese local de estrógeno também reduz a apoptose das células da granulosa de folículos pré-antrais de ratas *in vivo*, efeito este que é inibido pelo tratamento com testosterona (Quirk *et al.*, 2004). Murray *et al.* (2001) relataram que em cultivo de folículos pré-antrais de ratas, o ácido ascórbico reduz a apoptose e aumenta a porcentagem de folículos que mantém a integridade da membrana basal.

O estágio de folículo antral inicial é o mais crítico do desenvolvimento folicular em humanos e roedores. Esses folículos expressam receptores para o FSH e tornam-se dependentes dele para a sua sobrevivência (Markström *et al.*, 2002). O FSH é capaz de suprimir a apoptose em até 60%, sendo este efeito parcialmente revertido pela adição da proteína-3 ligante do IGF, IGFBP-3. Alguns estudos já verificaram que as proteínas ligantes de IGF-1 (BP2, BP4 e BP5) estão presentes no líquido folicular de folículos subordinados de bovinos, mas não nos folículos dominantes (Mihm *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2001; Beg *et al.*, 2001). Em contraste, a estimulação de receptores para LH tem efeito limitado sobre a sobrevivência de folículos antrais de ratas (Chun *et al.*, 1996). Os principais fatores produzidos localmente que são importantes para a sobrevivência de folículos antrais iniciais de ratos incluem o IGF-I, o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), a ativina e a interleucina 1 β . No entanto, vários destes fatores produzidos localmente são mais potentes como fatores de sobrevivência nas fases posteriores do desenvolvimento folicular (Kaipia e Hsueh, 1997; Markström *et al.*, 2002). Nestes folículos e nos mais maduros, as células da granulosa são as primeiras a se degenerar, enquanto que os ovócitos parecem resistir a apoptose até que, eventualmente, o folículo comece a regredir (Li *et al.*, 1998).

Na fase pré-ovulatória, os folículos expressam receptores para LH. Com isso, o LH junto com o FSH vão se tornar os principais reguladores fisiológicos dos folículos a partir desse estágio, sendo que a maioria dos fatores inibidores da atresia folicular é regulada pelo FSH e LH (Markström *et al.*, 2002). Chun *et al.* (1994) verificaram que o FSH e o LH suprimem a apoptose de folículos pré-ovulatórios isolados de ratas, e esse papel pode ser parcialmente mediado pelo IGF-1 endógeno e pela interleucina 1 β . O efeito da interleucina 1 β é provavelmente mediado pela geração de óxido nítrico e GMPc (Chun *et al.*, 1995). Outros fatores já identificados que também suprimem a apoptose *in vitro* das células da granulosa de folículos pré-ovulatórios são o EGF, o FGFb, a insulina e o hormônio do crescimento (GH), sendo o efeito deste último mediado pelo IGF-1 (Markström *et al.*, 2002). As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), estimuladas pelas gonadotropinas, também estão envolvidas na supressão da apoptose das células da granulosa (Li *et al.*, 1998).

Durante a etapa final do desenvolvimento folicular o número de corpos lúteos é igual ao número de folículos que respondem ao pico de LH, o que sugere diminuição da sensibilidade à apoptose nesses folículos. Após o pico de LH, os folículos pré-ovulatórios são menos sensíveis à apoptose *in vitro*, ou seja, à atresia, do que os folículos das fases anteriores (Svensson *et al.*, 2000).

Já em relação ao corpo lúteo a apoptose não ocorre durante a fase lútea ativa, mas somente durante a fase de regressão (Arfuso e Meyer, 2003) com a participação da caspase-3 (Carambula *et al.*, 2002). As caspases 2 e 9 também tem sido observadas durante a luteólise (Peluffo *et al.*, 2006). Algumas pesquisas sugerem que a progesterona suprime a atividade da caspase-3 (Svensson *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2004), a apoptose celular (Robker *et al.*,

2000) e a degeneração luteal (Young e Stouffer, 2004) no corpo lúteo de espécies com longas fases luteínicas durante o ciclo ovariano. Takiguchi *et al.* (2004) também observaram que o aleitamento em ratas inibe a ocorrência da apoptose envolvida na regressão luteal pós-parto, sugerindo um efeito anti-apoptótico da prolactina. A vascularização do corpo lúteo durante a gestação não sofre apoptose como as células luteínicas (Arfuso e Meyer, 2003).

A atresia folicular também está associada com o desenvolvimento inadequado e/ou regressão da vascularização da teca na maioria das espécies estudadas (Parborell *et al.*, 2008). A redução de VEGF-A, do seu receptor Flk-1/KDR e da angiopoetina-1, decorrente da administração de um agonista de GnRH, é um dos mecanismos envolvidos na apoptose das células ovarianas (Parborell *et al.*, 2008).

Uma vez que a decisão da morte celular é estabelecida, a execução da apoptose requer a ativação coordenada e programada de vários sub-programas (Hengartner, 2000). Duas importantes famílias reguladoras do processo de apoptose são a família das caspases e a família do Bcl-2. Caspases são consideradas as executoras da apoptose por ativar a DNase ativada pela caspase (CAD), uma endonuclease responsável pela fragmentação do DNA internucleossômico, que é uma das vias mais utilizadas pela apoptose (Hengartner, 2000). Já a família do Bcl-2 é formada por reguladores apoptóticos que compreendem dois membros anti-apoptóticos, o Bcl-2 e o Bcl-xl, e membros pró-apoptóticos, que incluem o Bax, Bid, Bik, DBO e a Bcl-xs. A função principal da família do Bcl-2 é a de regular a liberação de fatores pró-apoptóticos, em particular do citocromo C, da mitocôndria para o citosol (Quirk *et al.*, 2004). Muitos membros da família do Bcl-2 foram isolados do ovário, incluindo o BAD, Mcl-1 e o Bok (Hsu e Hsueh, 2000).

Outra via de apoptose que também tem sido descrita no ovário é a expressão de Fas e FasL, sendo a expressão delas elevada em folículos subordinados de bovino em comparação a folículos dominantes (Quirk *et al.*, 2004).

Há evidências de uma íntima relação entre o ciclo de proliferação celular e a susceptibilidade à apoptose das células (Schutte e Ramaekers, 2000). No embrião em desenvolvimento e em tecidos adultos, a apoptose ocorre com maior frequência nos tecidos com alta taxa proliferativa do que os com menor atividade. Em contrapartida, as células que saem do ciclo celular na diferenciação terminal são resistentes à apoptose (Quirk *et al.*, 2004). As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios de bovinos que saem do ciclo celular, em resposta ao pico de LH, são resistentes à apoptose, e pouca apoptose é observada em pequenos folículos com crescimento lento. Essa propriedade pode ser importante para a sobrevivência a longo prazo do corpo lúteo (Quirk *et al.*, 2004). Assim, as células da granulosa que estão na fase inicial do ciclo celular – fase G1 (células da granulosa de folículos primordiais e pré-antrais) são mais resistentes à apoptose do que as células que estão na transição da fase G1 para S (células da granulosa de folículos terciários) (Quirk *et al.*, 2004). Cistos foliculares em ovários de ratas apresentam uma combinação de fraca atividade proliferativa com baixos níveis de apoptose na parede folicular, o que poderia explicar por que os folículos císticos crescem lentamente e, em seguida, mantém uma condição estática, sem degeneração, resultando na sua persistência (Salvetti *et al.*, 2009).

3. Cicloxigenases e seu papel na atividade e vascularização ovariana

As prostaglandinas, produto da ação das cicloxigenases, são importantes mediadoras de uma variedade de processos biológicos e patológicos, e têm sido implicadas em uma

série de funções reprodutivas da fêmea que incluem a ovulação, fecundação, luteólise, implantação embrionária e parto (Sirois *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001; Lim e Dey, 2002; Olson, 2003; Goff, 2004; Sirois *et al.*, 2004).

As prostaglandinas, juntamente com as prostaciclina (PGI) e os tromboxanos (TX), são conhecidos como prostanóides, que pertencem a uma grande família de biomoléculas contendo uma estrutura de 20 carbonos, os eicosanóides (Smith e Marnett, 1991; Funk, 2001). Todos os prostanóides são derivados de ácidos graxos armazenados nas membranas celulares e sua biossíntese pode ser dividida em três etapas: liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos da membrana celular pela ação das enzimas fosfolipase A2; conversão do ácido araquidônico em uma prostaglandina intermediária instável (PGH₂) pela ação das ciclooxigenases; e conversão da PGH₂ em vários prostanóides biologicamente ativos (prostaglandina E₂ e F_{2α}) (Smith e Marnett, 1991; Murakami e Kudo, 2004; Sirois *et al.*, 2004). As ações desses prostanóides são mediadas por receptores que compreendem quatro subtipos: EP1, EP2, EP3 e EP4. Estes subtipos são codificados por genes diferentes e diferem em suas vias de transdução de sinal: o subtipo EP1 é acoplado a mobilização de cálcio, o EP2 e o EP4 à formação de AMPc e o EP3 à inibição da guanilato-ciclase (Segi *et al.*, 2003).

Entre as cicloxigenases, a COX-1 é constitutivamente expressa em uma variedade de células, mas a expressão da COX-2 requer a indução, que pode ser realizada por vários agentes que incluem mitógenos, citocinas e os promotores de crescimento tumoral. No ovário, a expressão de COX-2 e a síntese das prostaglandinas F_{2α} e E₂ ocorrem não somente na ruptura folicular durante a ovulação como também durante todo o período de vida do corpo lúteo, o qual varia de acordo com a espécie

animal (Sakurai *et al.*, 2003; Arosh *et al.*, 2004).

No hipotálamo, as prostaglandinas estimulam a secreção do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH), resultando na liberação das gonadotropinas FSH e principalmente de LH (Davis *et al.*, 1999). Já o pico pré-ovulatório de LH resulta seletivamente na biossíntese da COX-2 pelas células da granulosa de diferentes espécies de mamíferos (roedores, eqüinos, bovinos e em humanos), que por sua vez aumentam rapidamente a síntese da prostaglandina E2 no fluido folicular (Sirois *et al.*, 2004; Ben-Ami *et al.*, 2006). Essa prostaglandina aumenta a atividade proteolítica e reduz a síntese de componentes da membrana basal das células da granulosa de folículos pré-ovulatórios e do epitélio ovariano, como também induz a apoptose desse epitélio. Tudo isso promove a ruptura da parede folicular com subsequente ovulação (Pon e Wong, 2006). O intervalo entre o início da onda pré-ovulatória de LH e a ruptura do folículo varia entre os roedores (14 horas), bovinos (28-30 horas), e eqüinos (36-48 horas), mas a expressão de COX-2 nas células da granulosa e a elevação da concentração de prostaglandina ocorre em cada uma dessas espécies 10 horas antes da ruptura do folículo. A elevação de COX-2 e de prostaglandina no fluido folicular são fatores determinantes que controlam o tempo de ovulação nos mamíferos (Sirois e Dore, 1997).

No entanto, níveis basais de expressão de COX, principalmente de COX-1, são encontrados no estroma e nas células teca interna, sugerindo sua participação na manutenção dos níveis basais de prostaglandinas no ovário (Davis *et al.*, 1999). Interessante é que em primatas foi demonstrada a expressão de COX-2 na camada da teca de folículos pré-ovulatórios (Duffy e Stouffer, 2001), além das células da granulosa, em contraste ao observado por

outros pesquisadores que relatam ausência da expressão de COX-2 nas camadas da teca dos folículos de animais domésticos (Liu *et al.*, 1997; Sirois e Dore, 1997).

Já no corpo lúteo, a expressão de COX-2, PGE2 e de PGF2 α é altamente modulada, enquanto que a expressão de outras enzimas ocorre em nível constante durante todo o ciclo de vida do corpo lúteo. Comparando-se com a expressão de PGF2 α , a expressão de PGE2 é maior no crescimento, inferior na regressão, e semelhante no corpo lúteo maduro. Essa expressão diferenciada das prostaglandinas corrobora com a função luteal, sendo a PGF2 α predominantemente luteolítica e a PGE2 luteotrópica. A expressão delas e da COX-2 é preferencialmente maior nas células luteínicas em comparação a outros tipos celulares (Sakurai *et al.*, 2003; Arosh *et al.*, 2004).

Uma vez que a COX-2 é a principal responsável pela produção de prostaglandinas durante o processo inflamatório, esta isoforma é alvo para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios seletivos (El-Nefiawy *et al.*, 2005). Mas seu uso tem resultado em distúrbios reprodutivos na fêmea como a síndrome do folículo luteinizado, anormalidades na ovulação como falhas na expansão do *cumulus oophorus* e ruptura anormal do folículo com liberação do fluido folicular e dos ovócitos para o estroma, além de alterações na fertilização, implantação e decidualização (Matsumoto *et al.*, 2001; Gaytán *et al.*, 2006). Além disso, estudos mais recentes têm verificado que a alteração na atividade ovariana resultante desses fármacos também está relacionada a distúrbios na angiogênese luteal (Sakurai *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2005) e, por isso, os efeitos autócrinos e/ou parácrinos das prostaglandinas luteais podem estar envolvidos no controle das funções e do tempo de vida do corpo lúteo (Arosh *et al.*, 2004).

No corpo lúteo recém formado, a prostaglandina E2 e o tromboxano A2 estimulam a angiogênese e a permeabilidade vascular (Sakurai *et al.*, 2005), havendo possibilidade de que esses eicosanóides estejam envolvidos na síntese de progesterona e no aumento do fluxo sanguíneo induzido pelo VEGF (Sakurai *et al.*, 2004). Uma vascularização proeminente no corpo lúteo é indispensável para fornecer colesterol às células luteínicas e promover a síntese e liberação de progesterona (Sakurai *et al.*, 2004). Assim, o corpo lúteo funcional é fundamental para a manutenção da gestação tanto em humanos como nas diversas espécies de animais domésticos (Arosh *et al.*, 2004).

4. Fecundação e blastogênese

O sucesso da fecundação vai depender da capacidade dos espermatozóides viáveis, presentes nas vias genitais femininas, de penetrar a zona pelúcida e fertilizar o ovócito. Para isso, eles sofrem algumas modificações em sua estrutura como a remoção de glicoproteínas da superfície celular e a ativação de enzimas hidrolíticas que o tornarão apto a fecundar o ovócito. Esse processo é denominado de capacitação (Hafez, 1993; Cunningham, 2004).

Após a fertilização na tuba uterina, o óvulo fertilizado ou zigoto se move em direção ao útero onde sofre várias divisões celulares. Por meio dessas mitoses e clivagens sucessivas, o zigoto dará origem à mórula (Guillomot *et al.*, 1993). E à medida que ela chega ao útero, ocorre a formação do blastocisto. A passagem do blastocisto da tuba uterina para o útero é controlada pela ação do estrógeno, pelos fracos movimentos peristálticos da tuba uterina e pelos movimentos ondulares dos cílios das células epiteliais (Bishop, 1969). O período de chegada do embrião ao útero é variável entre as espécies animais, mas na rata esse período corresponde ao 3º ou 4º dia após a cópula (Guillomot *et al.*, 1993).

O blastocisto, que contém uma blastocele, vai consistir de dois tipos celulares: o trofoectoderma, uma camada externa de células que se divide rapidamente, e a massa celular interna, formada por células cuboidais indiferenciadas e que faz saliência para o interior da cavidade (Hafez, 1993; Weitlauf, 1994; Imakawa *et al.*, 2004). Ambas as células do blastocisto serão essenciais para o desenvolvimento embrionário: o trofoectoderma está envolvido nas interações com o útero resultando na implantação e na formação da placenta, enquanto a massa celular interna dará origem aos folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma) e ao embrião. A interação, associação e o desenvolvimento dos folhetos embrionários resultam na formação das membranas fetais e na diferenciação dos tecidos e órgãos do feto (Guillomot *et al.*, 1993).

Após a diferenciação da massa celular interna e das células trofoblásticas, o blastocisto eclode da zona pelúcida e adquire a habilidade de aderir ao útero (Imakawa *et al.*, 2004). Só quando o útero e o concepto desenvolvem de forma sincronizada, a adesão poderá ocorrer entre as células trofoblásticas e o endométrio (Imakawa *et al.*, 2004).

5. Implantação embrionária

A implantação do embrião envolve uma série complexa de interações sequenciais entre o embrião e o útero, começando com a fixação do blastocisto ao epitélio endometrial e culminando com a formação da placenta definitiva (Kennedy *et al.*, 2007). Todo esse processo é coordenado pela ação da progesterona e, em algumas espécies, pelo estrógeno, que irão regular de forma autócrina e/ou parácrina a produção local de citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição homeobox e de prostaglandinas (Paria *et al.*, 2002; Bazer *et al.*, 2010). O objetivo da implantação é estabelecer o contato entre o blastocisto e o

sangue materno, proporcionando assim ao blastocisto os nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento (Bazer *et al.*, 2010).

O processo de implantação é bastante variável entre os mamíferos, especialmente no âmbito da invasão trofoblástica no endométrio que dará origem às estruturas placentárias (Kennedy *et al.*, 2007). Em ruminantes, suínos e eqüinos, a implantação não é intersticial, diferente do que ocorre em roedores, carnívoros, primatas e humanos, onde a implantação é intersticial (Bazer *et al.* 2009).

O íntimo contato entre o córion, derivado do trofoectoderma, e o epitélio de revestimento uterino, é mantido intacto em suínos e eqüinos durante a gestação (placenta epiteliocorial). Já em ruminantes, algumas células binucleadas que se originam do trofoectoderma tem a capacidade de migrar e se fundir uma com as outras e com o epitélio de revestimento uterino formando placas de sincícios multinucleados (placenta sinepteliocorial). As células binucleadas trofoblásticas e os sincícios formados são fonte de lactogênio placentário, bem como de outros hormônios como a progesterona (Wooding *et al.*, 1992). Em ambas as placentas, epiteliocorial e sinepteliocorial, o conceito permanece dentro do lúmen uterino durante a gestação. Em ruminantes, o contato entre o córioalantóide (cotilédone) e a carúncula, sítio discreto da mucosa endometrial desprovida de glândulas uterinas, leva ao desenvolvimento do placentoma, uma estrutura altamente vascularizada. Os placentomas em ruminantes são críticos para a troca de nutrientes e gases através da placenta (Reynolds *et al.*, 2005).

Já em carnívoros, roedores, primatas e no homem, onde a implantação é intersticial, o blastocisto penetra profundamente o estroma endometrial e, em seguida, o epitélio endometrial é restaurado sobre o local da

implantação. Durante o contato inicial, o trofoectoderma, que é altamente proliferativo, dá origem ao sinciotrofoblasto, que vai estabelecer uma aderência estável com o epitélio de revestimento uterino através da penetração das células trofoblásticas na parede uterina. A perda das células endoteliais para a formação de seios sanguíneos com sangue materno em humanos, primatas superiores e roedores, dá origem à placenta hemocorial, diferente da placenta dos carnívoros que é endoteliocorial, uma vez que os vasos maternos mantêm preservada a camada endotelial (Bazer *et al.*, 2010).

Na rata, os eventos que resultam na implantação do blastocisto ocorrem durante os seis primeiros dias de gestação. O primeiro dia de gestação, definido como o dia do acasalamento, é considerado representante do estro (Murphy, 1993). O terceiro dia representa o período de pré-implantação. A aposição do blastocisto na parede uterina ocorre no quinto dia. Já a implantação definitiva, definida pela adesão irreversível do blastocisto ao epitélio uterino, se completa no sexto dia. No sétimo dia, finaliza a entrada do blastocisto na mucosa uterina. Durante esse processo, a lâmina basal será destruída e removida pela atividade fagocitária dos macrófagos presentes no sangue materno (Tassel *et al.*, 2000). No camundongo, o útero se torna receptivo só no 4º ou 5º dia após a cópula (dia da implantação). À partir do 5º dia o útero já se torna refratário e não reconhece o blastocisto (Imakawa *et al.*, 2004).

Apesar das diferenças na duração do período de pré-implantação e do tipo de implante, os estágios iniciais de aposição e fixação embrionária são comuns entre as espécies animais (Spencer *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2008; Bazer *et al.*, 2009). As alterações funcionais no epitélio de revestimento uterino e no epitélio glandular superficial incluem a redução do glicocálice apical, a remodelação do citoesqueleto do epitélio

uterino e a perda da sua polaridade (Burghardt *et al.*, 2002).

Inicialmente, a quantidade de mucina-1, uma glicoproteína da superfície do epitélio de revestimento e glandular, reduz durante o período de pré-implantação em ratas, suínos e em cabras, ou nos locais de fixação do blastocisto, em humanos e coelhos, devido à ativação de proteases da superfície celular e perda da expressão de receptores de progesterona no epitélio glandular e de revestimento uterino (Bazer *et al.*, 2009). Além disso, a mecanotransdução da sinalização durante o período de pré-implantação vai depender da interação das caderinas e integrinas com os filamentos de actina da membrana plasmática (Bazer *et al.*, 2009). Essa fixação inicial é mediada por selectinas, galectinas, heparina, heparan sulfato proteoglicano, fatores de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidermal, CD44, fibronectina, fibronectina oncofetal, vitronectina, fosfoproteína-1 secretada (SSP1), laminina, proteína-1 ligante de IGF (IGFBP1) e pelo peptídeo associado à latência de uma ou mais isoformas do fator de crescimento transformante β (TGF β) (Fazleabas *et al.*, 2004; Kashiwagi *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009). Essas e outras integrinas, tanto de origem materna como do conceito, são críticas para a implantação embrionária (Kashiwagi *et al.*, 2007), sendo a expressão delas regulada pela expressão do Hoxa-10 (Imakawa *et al.*, 2004).

A expressão do gene Hoxa-10, um fator de transcrição homeobox, é controlada pelo estrógeno e pela progesterona no endométrio uterino de camundongos e humanos. Esse gene é parte do cluster A no cromossomo sete e codifica um fator de transcrição ligado ao DNA que pode regular a expressão gênica, morfogênese e diferenciação (Imakawa *et al.*, 2004). Mulheres com expressão aberrante de integrinas no endométrio frequentemente apresentam endometriose, que está associada com

infertilidade devido a um defeito de receptividade uterina e falha na implantação embrionária (Lessey *et al.*, 1994).

Interessante também é que a mecanotransdução durante o período de pré-implantação vai silenciar o complexo principal de histocompatibilidade de Classe I (MHC-1) e as moléculas de β 2-microglobulina que regulam a resposta imunológica de rejeição, para proteger o conceito que está em desenvolvimento (Bazer *et al.*, 2009). Durante esse período, várias citocinas são expressas no útero, mas só algumas são necessárias para a implantação trofoblástica. Dentre elas, pode-se citar o fator inibitório da leucemia (LIF), a interleucina-1 (IL-1) e as prostaglandinas (Imakawa *et al.*, 2004).

A nutrição histotrófica realizada pelo epitélio de revestimento e glandular uterino, a transferência hematotrófica de gases e nutrientes essenciais e a coordenada sinalização entre o trofoectoderma e o epitélio uterino são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do conceito, reconhecimento da gestação, implantação embrionária e placentação. Glicose, leucina e arginina são nutrientes que estimulam a proliferação das células trofocodérmicas (Bazer *et al.*, 2009). A arginina também é essencial para o crescimento e desenvolvimento feto-placentário, através do seu efeito sobre a síntese de óxido nítrico e de poliaminas que estimulam as funções vasculares e a síntese protéica e de DNA, respectivamente (Wu e Morris, 1998; Wu *et al.*, 2004). Assim, o aumento significativo no transporte útero-placentário de aminoácidos é necessário para o crescimento da placenta e do feto, uma vez que estudos em ovinos e suínos têm demonstrado que o atraso do crescimento intra-uterino está associado com prejuízo no transporte placentário de aminoácidos (Bazer *et al.*, 2009).

O controle endócrino da implantação envolve uma série altamente sincronizada de interações recíprocas entre o trofoectoderma e o endométrio uterino (Fazleabas *et al.*, 2004; Slayden e Keator, 2007; Spencer *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2008; Bazer *et al.*, 2009). A receptividade uterina à implantação requer ações da progesterona e/ou do estrógeno no útero para regular a síntese local de citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição homeobox e prostaglandinas, derivados das vias autócrina e parácrina. A receptividade do endométrio também requer o silenciamento da expressão do receptor de progesterona e/ou de estrógeno no epitélio de revestimento e glandular uterino. No entanto, a expressão do receptor de progesterona no útero continua nas células do estroma e do miométrio. Os efeitos da progesterona no epitélio uterino provavelmente são mediados por sua ação sobre as células estromais, estimulando a expressão de fatores de crescimento chamados de "progestamedinas" que atuam no epitélio de revestimento e glandular. Entre eles incluem os fatores de crescimento fibroblástico 7 (FGF7) e 10 (FGF10) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (Bazer *et al.*, 2009). Esses fatores também estimulam diretamente a proliferação e a função diferenciada das células trofoblásticas (Slayden e Keator, 2007).

6. Reconhecimento materno da gestação

O estabelecimento e a manutenção da gestação em mamíferos requerem que o corpo lúteo funcional seja mantido além do seu período cíclico normal para a produção contínua de progesterona. Esse hormônio é necessário para a atividade secretória do endométrio que é essencial para a implantação e desenvolvimento embrionário e para a placentação. O reconhecimento materno dos sinais da gestação oriundos do concepto pode ser luteotrófico, caso promova diretamente a função lútea, ou anti-luteolítico, se impedir a liberação pelo útero

da prostaglandina F2 α (PGF2 α), que causa a regressão do corpo lúteo (Fazleabas *et al.*, 2004; Soares, 2004; Spencer *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2008).

A gonadotropina coriônica, que atua como um sinal luteotrófico em primatas e humanos, age diretamente sobre o corpo lúteo, como faz a prolactina liberada pela adenohipófise em roedores em resposta ao acasalamento. Nos animais domésticos, os sinais anti-luteolíticos resultantes do concepto incluem o estrógeno e a prolactina em suínos, o interferon-tau (IFNT) em ruminantes, e talvez o estrógeno e o interferon delta (IFND), em eqüinos (Bazer *et al.*, 2008). Em carnívoros ainda não se tem informações. É importante ressaltar que embora o IFNT seja conhecido por agir como um sinal de reconhecimento da gestação, os IFNs parecem afetar a receptividade do útero, a decidualização e o crescimento e o desenvolvimento placentário em primatas, ruminantes, suínos e roedores (Bazer *et al.*, 2008; Bazer *et al.*, 2009).

Nos roedores, o acasalamento induz ondas diurnas e noturnas de prolactina, sendo este um sinal luteotrófico inicial para a formação do corpo lúteo e para a produção de progesterona até o 12^o dia de gestação. A prolactina aumenta a expressão de receptores para LH nas células luteais para a formação do corpo lúteo e suprime a atividade da enzima 20 α -hidroxiesteróide-desidrogenase. A supressão dessa enzima impede a conversão da progesterona em 20-hidroxiprogesteroa possibilitando a manutenção da gestação. Em seguida, os hormônios lactogênicos provenientes da placenta e da decídua uterina agem, via receptores para prolactina, nas células luteais para manutenção da produção de progesterona durante a gestação. A gestação em ratos, camundongos e hamsters dura cerca de 20 a 22 dias, e o corpo lúteo funcional deve produzir progesterona até o 17^o dia de gestação (Soares, 2004).

7. Decidualização

Durante a gestação, o útero sofre uma série de alterações morfológicas que resultam em ampla reorganização tecidual a fim de acomodar o conceito. No processo de implantação embrionária, algumas espécies animais apresentam pouca ou nenhuma invasão do trofoblasto no endométrio, enquanto em outras a invasão é extensa (Psychoyos, 1973). Nessas espécies em que a invasão é ausente ou limitada, o endométrio sofre poucas alterações em resposta a implantação. Em contrapartida, nas espécies com extensa invasão, o endométrio sofre importantes alterações morfológicas e funcionais que são referidas como transformação decidual do endométrio (Kennedy *et al.*, 2007).

A decídua constitui o lado materno da interface materno-fetal. Ela está envolvida no intercâmbio de moléculas entre os tecidos e é de fundamental importância para a gestação. É cada vez mais aparente que diferentes graus de diferenciação das células do estroma, semelhante à decidualização, é comum a todos os tipos de implantação. Assim, maior diferenciação ocorre nas espécies com implantação intersticial, como nos roedores e primatas, decidualização moderada nas espécies com placentação sinepteliocorial (bovinos), e decidualização limitada nas espécies com placentação epiteliocorial (equinos, suínos e ovinos) (Johnson *et al.*, 2009).

Em roedores, em resposta à implantação do blastocisto, os fibroblastos do estroma endometrial sofrem rápida proliferação e diferenciação em células com característica epitelióide, as células deciduais. A decidualização na rata começa no pólo antimesometrial do endométrio, próximo ao local de implantação do blastocisto, dando origem às células deciduais da zona primária decidual. Por volta do oitavo dia de gestação, a reação decidual atinge a zona basal, adjacente à camada muscular circular

do endométrio, formando a decídua antimesometrial, que atinge seu desenvolvimento máximo por volta do décimo dia. Posteriormente, ela regride para formar a decídua capsular. No oitavo dia, a diferenciação também se estende para o lado mesometrial do endométrio e forma a decídua mesometrial. Esse tecido atinge seu desenvolvimento máximo no 12º dia de gestação. Após o 14º dia, a decídua mesometrial começa a regredir para formar a decídua basal, que persiste até o final da gestação. Assim, as decíduas antimesometrial e mesometrial sofrem mudanças temporais e espaciais de regressão que são essenciais para o sucesso do desenvolvimento feto-placentário (Gu *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da decídua mesometrial é seguido pelo aparecimento de um terceiro tipo celular, as células granulares da glândula metrial, um tipo de células “*natural killer*” uterinas (uNKs) dos roedores, volumosas, que contêm perforina e granzima B em seus grânulos citoplasmáticos. Essas células são fundamentais para o desenvolvimento vascular e para infiltração dos trofoblastos no endométrio (Croy *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2009), como também para a manutenção das células deciduais por regular a sua expressão gênica através da secreção de IFNT (Correia-da-Silva *et al.*, 2004).

As células endoteliais na proximidade das células deciduais também proliferam e formam uma densa rede vascular no útero gravídico. A angiogênese decidual e a manutenção da vascularização após a implantação inicial é um requisito para a decidualização e para o desenvolvimento normal da gestação. Acredita-se que a rede vascular decidual recém-formada sirva como aparato para a primeira troca metabólica entre a mãe e o embrião, até que a placenta se torne funcionalmente competente (Kennedy *et al.*, 2007; Douglas *et al.*, 2009).

Sabe-se que a prostaglandina E2, além do seu envolvimento na vascularização endometrial, atua como intermediária na reação das células decíduais em ratos (Kennedy *et al.*, 2007). À medida que as células do estroma se diferenciam em células decíduais, elas expressam proteínas diferentes daquelas da matriz do citoesqueleto, exibindo acúmulo de proteínas filamentosas que incluem os microtúbulos, microfilamentos e os filamentos intermediários e da malha microtubular (Bazer *et al.*, 2010). Duas proteínas do citoesqueleto características das células decíduais são a desmina (Oliveira *et al.*, 2000) e a actina de músculo liso (Christensen *et al.*, 1995). Acredita-se que essas proteínas possam estar envolvidas nas alterações do crescimento, formação e secreção de proteínas pelas células do estroma, durante o processo de decidualização (Rao e Cohen, 1991). Funcionalmente, as células do estroma decidualizadas secretam prolactina (Tessier *et al.*, 2000) e proteína-1 ligante ao IGF (IGFBP1) (Kim *et al.*, 1999), que parecem restringir a invasão trofoblástica, além de outros fatores endócrinos e parácrinos (Popovici *et al.*, 2000; Brar *et al.*, 2001; Salamonsen *et al.*, 2002).

As células decíduais também acumulam outras proteínas da matriz extracelular que incluem laminina, fibronectina e fosfoproteína-1 secretada (SPP1). Sugere-se que esta última, expressa por células decíduais “natural killer” em ratos (White *et al.*, 2005) e pelas células do estroma em seres humanos (Von Wolff *et al.*, 2004), possa estar envolvida na angiogênese decidual. Além disso, a ligação da SPP1 a receptores para integrina no trofoectoderma e no epitélio de revestimento uterino estimula mudanças na proliferação, migração, sobrevivência e adesão de células do trofoectoderma. Ela também atua na remodelação do concepto durante o seu alongamento, em algumas espécies como no suíno, e na aderência do trofoectoderma ao

epitélio uterino durante o período de pré-implantação (Johnson *et al.*, 2003).

O resultado final da decidualização é a formação de um tecido morfológica e funcionalmente distinto, que produz hormônios, promove a nutrição do concepto, impede a rejeição fetal e regula a placentação, por limitar a invasão trofoblástica através da geração de um ambiente de citocinas com ação parácrina e autócrina (Lee *et al.*, 1997).

8. Placentação

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

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

Nos roedores, particularmente no camundongo fêmea e na rata, a placenta definitiva é discóide e se estabelece por volta do décimo dia de gestação. Ela possui anatomicamente e fisiologicamente três regiões distintas: o labirinto placentário, que é a maior porção do disco placentário; o

espongiotrofoblasto, também chamado de zona juncional ou trofoespôgio, que é formado da parede original do blastocisto e permanece unicelular; e o sinciotrofoblasto, também chamado de camada de células gigantes trofoblásticas, que é formado a partir da penetração das células trofoblásticas no endométrio (Cross, 2000; Hemberger e Cross, 2001; Burdon *et al.*, 2007).

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

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

O espongiotrofoblasto atua como um compartimento glandular endócrino, para manter a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, além de outras funções. O espongiotrofoblasto e, secundariamente, o sinciotrofoblasto, produzem hormônios luteotróficos e lactogênicos durante a gestação. Esses hormônios pertencem à família dos hormônios estruturalmente relacionados à prolactina adenohipofisária (PRL), proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) e citocinas (Ain *et al.*, 2003; Malassine *et al.*, 2003; Cross, 2005; Coan *et*

al., 2006). Outra suposta função para o espongiotrofoblasto é a de limitar o crescimento do endotélio materno na placenta fetal, pela secreção de fatores anti-angiogênicos como as proteínas Flt1 e as relacionadas à proliferina (He *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2002). Em casos de alteração do desenvolvimento placentário, há mudança qualitativa no equilíbrio entre as células citotrofoblásticas e as células de glicogênio (Milstone *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Coan *et al.*, 2006).

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

Sugere-se também que as células de glicogênio sejam análogas às do trofoblasto extraviloso invasivo humano, isto é, elas invadem as artérias espiraladas maternas que levam sangue ao local da implantação e corroem a parede muscular arterial. Esse processo resulta em maior fluxo de sangue, oxigênio e nutrientes para o local da implantação. Em ratas, as células de glicogênio invadem a decídua materna e podem se fundir ou interagir com as células uNKs, estimulando elas a modificar as artérias espiraladas (Croy *et al.*, 2000). Uma vez na decídua, as células de glicogênio entram em um processo citolítico com liberação de seus componentes intracelulares que incluem o glicogênio e hormônios para o interstício decidual. É provável que esses componentes sejam importantes como fonte de energia e para o controle hormonal da

gestação tardia e/ou do feto (Bouillot *et al.*, 2006). Mann *et al.* (2003) também demonstraram em camundongos alto nível de expressão de ciclooxygenases nas células de glicogênio no final da gestação, suspeitando do seu envolvimento para a ocorrência do parto. As ciclooxygenases são marcadores de estresse oxidativo por indicar lesão de hipóxia-reoxigenação, que pode ser parte do processo de trabalho de parto (Mann *et al.*, 2003).

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

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

O sinciotrofoblasto, localizado mais externamente na periferia da unidade fetoplacentária, é constituído por células gigantes trofoblásticas que possuem núcleos

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

8.1 Diferenciação trofoblástica

Durante a implantação, que é o passo inicial da placentação, o trofoectoderma que infiltra no epitélio endometrial se diferencia em uma variedade de subtipos celulares e cada um com funções específicas (Cross, 2005). O trofoectoderma não contribui para a formação de nenhum tecido fetal, mais contribui para a formação da placenta e dos demais anexos embrionários. Sua proliferação e diferenciação o tornam o maior componente da placenta (Armant, 2005). Já a massa celular interna, outra categoria celular do blastocisto, dá origem ao embrião e aos folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). A interação, associação e desenvolvimento desses folhetos resultam na diferenciação dos tecidos e órgãos do feto e também na formação das membranas fetais (Guillomot *et al.*, 1993).

Após a aposição do blastocisto, o trofoectoderma polar, porção que recobre a

massa celular interna e que não tem contato com o endométrio, dá origem ao cone ectoplacentário. As células tronco trofoblásticas emergem deste cone ectoplacentário para se diferenciar nas células citotrofoblásticas. Elas dão origem à camada do espongiotrofoblasto e às células trofoblásticas do labirinto placentário. As células citotrofoblásticas proliferam em resposta a um contato estreito com a massa celular interna, mediado pelo fator de crescimento fibroblástico 4 (FGF4) (Cross, 2000; Adamson *et al.*, 2002; Cross, 2005). Já o trofoectoderma mural, porção que não recobre a massa celular interna, dá origem às células gigantes trofoblásticas (Cross *et al.*, 2002).

O sinciotrofoblasto surge a partir da fusão das células trofoblásticas que deixam o ciclo celular e param de se dividir, ampliando e eventualmente passando por ciclos de replicação do DNA, sem a ocorrência de mitoses (endoreduplicação), para se tornarem poliplóides. A diferenciação do sinciotrofoblasto não começa até que ocorra a fixação do corioalantóide no endométrio uterino, que é por volta do 8,5º dia de gestação, quando ocorre o contato com o alantóide que fornece um sinal que inicia o processo de diferenciação (Cross, 2005).

Os eventos moleculares envolvidos na diferenciação do trofoectoderma e da massa celular interna em linhagens celulares distintas ainda não são totalmente conhecidos (Imakawa *et al.*, 2004). Postula-se que fatores de transcrição tenham um papel crítico na promoção e no direcionamento dessa primeira diferenciação. Os primeiros fatores de transcrição a serem expressos, Eomes (gene T-box Eomesodermina) e Cdx-2 (gene Cdx-2 homeobox), influenciam na diferenciação das células trofoblásticas durante o período de pré-implantação (Russ *et al.*, 2000; Imakawa *et al.*, 2004). Durante a implantação e no período pós-implantação, ocorre a expressão sequencial dos fatores de

transcrição: Hand1, AP-2 γ (proteína gama 2 ativada), ETs-2, H β -58 e Mash2 que resulta na expressão de metaloproteinase 9 que regula a invasão trofoblástica no endométrio materno de roedores (Imakawa *et al.*, 2004).

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

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

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

o desenvolvimento do concepto (Watson e Cross, 2005).

8.2 Angiogênese placentária

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

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

Uma das adaptações locais mais importantes durante a gestação é a mudança do fluxo sanguíneo materno para o local de

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

Em roedores, durante o desenvolvimento e remodelamento vascular da placenta, duas linhagens trofoblásticas infiltram-se na decídua uterina: os trofoblastos endo/perivasculares e os trofoblastos intersticiais. Os trofoblastos endo/perivasculares, que representam um tipo especializado de célula gigante trofoblástica, infiltram na decídua a partir do 10º dia de gestação, associado à parede das

artérias (Cross *et al.*, 2002). O mesmo tipo celular pode ser comparado ao trofoblasto extraviloso humano, que infiltra nas artérias espiraladas e desestabiliza o músculo liso vascular (Reynolds *et al.*, 2010). Já as células trofoblásticas intersticiais que invadem a decídua não expressam marcadores de células gigantes trofoblásticas (Plf e Hand-1). Elas apresentam morfologia característica das células de glicogênio e não entram no lúmen das artérias espiraladas. A função delas ainda é desconhecida e sua localização se restringe apenas ao interstício e ao redor dos vasos deciduais (Cross *et al.*, 2002). Essas duas vias de invasão, intersticial e endo/perivascular, são afetadas por fatores maternos. A invasão intersticial é afetada quando ocorre aumento do teor de oxigênio e redução da proliferação celular na placenta. Já a via endo/perivascular é influenciada pela apoptose dos trofoblastos perivasculares e intramurais que é induzida por macrófagos deciduais. Ambos os eventos limitam o número e o grau de adaptação das artérias espiraladas, para atender às necessidades do feto em crescimento (Huppertz *et al.*, 2006).

Durante a gestação, a perda de músculo liso das artérias espiraladas de camundongos não tem sido associada com a invasão trofoblástica como é visto em humanos, mas por ação das células “*natural killer*” uterinas (Guimond *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 2000). Camundongos mutantes, sem células *natural killer* uterinas, apresentam artérias espiraladas anormais, com diâmetro vascular menor que o normal e persistência das camadas de músculo liso. Esses animais apresentam redução da fertilidade, mas não chegam a ser inférteis (Guimond *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 2000). Curiosamente, uma invasão trofoblástica decidual mais extensa foi observada em ratas deficientes em células *natural killer*, sugerindo que as células trofoblásticas podem tentar compensar o comprometimento da vascularização decorrente da ausência

dessas células (Cross *et al.*, 2002). Em humanos, as células *natural killer* também estão presentes no útero. Acredita-se que elas possam mediar a dilatação das artérias deciduais que ocorre no início da gestação na ausência de interações celulares com o trofoblasto extraviloso (Craven *et al.*, 1998).

Três das patologias mais comuns na gestação de humanos, representadas por retardo do crescimento intra-uterino, aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, parecem estar associadas com alterações no desenvolvimento vascular da placenta. Essas alterações podem ser o reflexo do descontrole gênico de fatores angiogênicos, uma vez que várias dessas patologias estão ligadas à falhas na expressão do VEGF (Redmer *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008). As pesquisas destacam que o defeito de um único gene pode ser suficiente para impedir o desenvolvimento vascular normal da placenta e, assim, comprometer a gestação.

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

8.3 Fatores angiogênicos placentários

Os fatores produzidos pelas células gigantes trofoblásticas, que fazem com que o revestimento endotelial dos vasos

sanguíneos seja substituído por células trofoblásticas, são desconhecidos (Cross *et al.*, 2002). Mas acredita-se que uma matriz complexa de agentes pró-angiogênicos, anti-angiogênicos e vasoativos sejam produzidos pelas células gigantes trofoblásticas e/ou por outras células trofoblásticas ou decíduais (Cross *et al.*, 2002; Borowicz *et al.*, 2007; Douglas *et al.*, 2009). Como vários desses fatores já foram descritos anteriormente, aqui será feita menção somente sobre seus efeitos na placenta.

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

O fator de crescimento placentário (PIGF) atua juntamente com o VEGF no desenvolvimento vascular da placenta (Vuorela *et al.*, 1997; Smith, 2000; Plaisier *et al.*, 2007). Ele tem as mesmas ações bioquímicas e funcionais do VEGF, mas só atua através do Flt-1. O PIGF e o VEGF têm efeitos sinérgicos sobre a angiogênese, mas os vasos formados pela ação do PIGF são mais maduros e estáveis do que os induzidos pelo VEGF (Carmeliet *et al.*, 2001). O PIGF é amplamente expresso na placenta humana podendo ser um importante regulador parácrino da angiogênese decidual e um mediador autócrino da função trofoblástica (Sherer e Abulafia, 2001; Plaisier *et al.*,

2007). Em humanos, a expressão de VEGF e de Flk-1 é mais intensa no início da gestação e diminui com o avançar dela (Jackson *et al.*, 1994), enquanto a expressão de PIGF e de Flt-1 aumenta no decorrer da gestação (Clark *et al.*, 1996).

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

As angiopoetinas também regulam o crescimento e o desenvolvimento vascular útero-placentário pela sinalização do seu receptor, Tie2. Camundongos com deleção gênica para angiopoetina-1 (Ang-1) apresentam defeitos cardiovasculares e morrem no terço médio da gestação. A ang-1 não estimula a proliferação das células endoteliais, mas afeta a organização microvascular, a estabilidade e a sobrevivência das células endoteliais necessárias para o remodelamento vascular. Já Ang-2 é um antagonista funcional da Ang-1, levando ao enfraquecimento das interações celulares e permitindo o acesso de indutores angiogênicos como o VEGF (Geva e Jaffe, 2000). Não tem sido observada relação das angiopoetinas com aborto, mas a expressão endotelial reduzida de Tie-2 tem sido associada à ocorrência de aborto (Vuorela *et al.*, 2000).

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

Fatores anti-angiogênicos também são expressos na placenta em desenvolvimento. Nas células do espongiotrofoblasto, uma proteína solúvel, a sFlt-1, se liga ao VEGF expresso pelas células trofoblásticas gigantes e atua como antagonista da ligação do VEGF ao seu receptor (He *et al.*, 1999; Maynard *et al.*, 2003). Já a proteína relacionada à Proliferin (Plfr), originalmente denominada PrP, antagoniza os efeitos angiogênicos da FLP (Jackson *et al.*, 1994). Similar à expressão da sFlt1, a Plfr é expressa pelo espongiotrofoblasto, mas também pela camada de células gigantes trofoblásticas. Postula-se que a expressão de fatores anti-angiogênicos logo abaixo da camada de células gigantes impeça o crescimento do endotélio materno dentro da camada do espongiotrofoblasto (Plaisier *et al.*, 2009).

O oxigênio é um importante regulador do equilíbrio entre as funções do VEGF e do

PlGF. Em humanos e roedores, na placenta e tecidos corioalantóideos relacionados, o VEGF é regulado pela hipóxia e reprimido pelo excesso de oxigênio. No primeiro trimestre do desenvolvimento placentário em humanos, ocorre um ambiente de relativa hipóxia que estimula a proliferação do citotrofoblasto e inibe a invasão trofoblástica. Com base nisso, foi verificado que um dos principais eventos que dão origem à pré-eclâmpsia é o fracasso do trofoblasto em invadir as artérias espiraladas com subsequente isquemia placentária. Ratas com redução da perfusão uterina apresentam aumento da pressão arterial, aumento plasmático e placentário de sFlt-1 e redução das concentrações plasmáticas de PlGF e de VEGF (Smith e Wear, 2009).

Existem várias outras vias importantes de sinalização, que modulam a angiogênese e que não serão discutidas nesta revisão por não terem feito parte do escopo deste estudo. Essas vias são representadas pelos prostanóides (Jabbour *et al.*, 2006), angiotensina (Sugawara e Ito, 2006), bem como pelas integrinas e pelas metaloproteinases de matriz (Bayless e Davis, 2003).

9. Proliferação e apoptose durante a gestação

Durante a gestação, o útero sofre uma série de alterações morfofuncionais cujo objetivo é acomodar o conceito em crescimento. Essa ampla reorganização tecidual depende do equilíbrio entre proliferação e morte celular, que desempenha papel crucial para a implantação do embrião e manutenção da gestação (Correia-da-Silva *et al.*, 2004). O aumento da taxa de apoptose está associado a distúrbios gestacionais em humanos (Kokawa *et al.*, 1998; Huppertz *et al.*, 2006; Burdon *et al.*, 2007).

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo dependente de energia caracterizado por alterações morfológicas e

bioquímicas, que incluem condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação do DNA com manutenção da integridade da membrana citoplasmática e, finalmente, culmina com a formação de corpos apoptóticos. Todos os membros da subfamília da caspase, representados pelas caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10, participam da cascata de apoptose. Essa subfamília é dividida em caspases sinalizadoras ou iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e caspases efetoras ou de execução (caspases 3, 6, e 7). A principal diferença entre os membros dos dois grupos é que as caspases iniciadoras são ativas e reversíveis durante os estágios iniciais da cascata de apoptose, enquanto que a ativação das caspases efetoras ocorre após a ativação das caspases iniciadoras, sendo irreversível e resultando em apoptose. As caspases são sintetizadas como enzimas inativas, sendo necessária sua clivagem para que suas funções biológicas ocorram (Whitley e Cartwright, 2009).

Nos roedores, a resposta do útero à implantação envolve processos sequenciais de crescimento, diferenciação e regressão em regiões distintas do útero, em diferentes períodos de tempo (Correia-da-Silva *et al.*, 2004). A transição da hiperplasia miometrial para hipertrofia, no terço médio da gestação de ratas, está associada com a ativação transitória das caspases, mas não com características morfológicas ou bioquímicas de apoptose (Shynlova *et al.*, 2006). Pelo menos parte da cascata de apoptose está envolvida na diferenciação normal de alguns tecidos (Ishizaki *et al.*, 1998; Weil *et al.*, 1999). Assim, postula-se que a sinalização de apoptose no miométrio gestante determina o fim da fase proliferativa e o início da hipertrofia na fase de crescimento uterino. Curiosamente, a principal proteína anti-apoptótica, Bcl-2, que impede a ativação da cascata de apoptose, é expressa em grande quantidade nesse período de transição (Shynlova *et al.*, 2006).

Durante a gestação, as decíduas mesometrial e antimesometrial sofrem regressão por apoptose, sendo esse processo essencial para o sucesso do desenvolvimento feto-placentário (Correia-da-Silva *et al.*, 2004). O mesmo ocorre nas células trofoblásticas de humanos, onde as caspases iniciadoras 8 e 10 são ativadas durante a diferenciação dos citotrofoblastos, presumivelmente naqueles destinados à fusão sincicial, necessária para a formação, crescimento e manutenção da camada do sinciotrofoblasto. Já as caspases efetoras 3, 6 e 7 são expressas apenas na sua forma inativa no citotrofoblasto (Huppertz *et al.*, 2006).

Como a proliferação celular e a apoptose ocorrem simultaneamente durante a remodelação de tecidos, ambos os processos devem estar em equilíbrio no útero gestante, uma vez que alterações no processo de apoptose na unidade útero-placentária e/ou no sistema genital feminino são observadas em vários distúrbios gestacionais. Em humanos, falhas na gestação durante o primeiro trimestre têm sido associadas à maior incidência de apoptose no sinciotrofoblasto e à redução da expressão de Bcl-2 (Savion *et al.*, 2002). Aumento da taxa de apoptose também foi demonstrado em células do sinciotrofoblasto e na decídua de mulheres que abortam espontaneamente e que apresentam gravidez ectópica (Kokawa *et al.*, 1998). Nos casos de restrição do crescimento intra-uterino (Smith *et al.*, 1997) e pré-eclampsia (Hayakawa *et al.*, 1995) em humanos, e parto prematuro em camundongos (Kakinuma *et al.*, 1997), foi observado aumento da taxa de apoptose das células trofoblásticas.

10. Efeito dos hormônios tireoidianos na reprodução da fêmea

Os hormônios tireoidianos são vitais para a função reprodutiva normal. A tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) agem diretamente no tecido uterino, placentário e ovariano, via receptores específicos, modulando o

metabolismo e o desenvolvimento desses órgãos (Galton *et al.*, 2001; James *et al.*, 2007). A presença de receptores específicos para T3 no interior do núcleo das células uterinas endometriais e miometriais e das células foliculares e estromais do ovário sugere a participação direta desse hormônio sobre esses tecidos (Evans *et al.*, 1983; Mukku *et al.*, 1983; Mauro *et al.*, 1992). Já a placenta também acumula e metaboliza T3 e T4 materno (Calvo *et al.*, 1992), além de expressar receptores para esses hormônios (Leonard *et al.*, 2001). Desse modo, o hormônio tireoidiano de origem materna influencia o desenvolvimento fetal, não só pelo fato de o feto depender dele, durante um período da sua vida, para o seu desenvolvimento, mas por agir diretamente no desenvolvimento do tecido placentário (Mauro *et al.*, 1992).

A síntese de T3 e T4, bem como os mecanismos reguladores dessa síntese e da liberação desses hormônios é semelhante em humanos e animais (Choksi *et al.*, 2003). O hormônio estimulador da tireóide (TSH), que é secretado pela adenohipófise, regula a síntese e a secreção desses hormônios. Já o hormônio liberador da tireotropina (TRH) é secretado pelo hipotálamo e regula a secreção de TSH hipofisário. O TSH, o TRH e os hormônios tireoidianos vão formar o eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano (HPT), de forma que o controle das concentrações circulantes dos hormônios tireoidianos vai ser regulada por mecanismos de *feedback* (Scanlon e Toft, 2000). Em geral, o aumento das concentrações sanguíneas dos hormônios da tireóide inibe a liberação de TRH e TSH, ocorrendo o contrário quando os níveis séricos dos hormônios tireoidianos diminuem (Choksi *et al.*, 2003).

A T3 e a T4 são compostas de dois resíduos tirosil, ligados por uma ligação de éter, e substituídas por três ou quatro resíduos de iodo, respectivamente. T3 é o hormônio biologicamente ativo, enquanto T4, que é o

principal hormônio secretado pela glândula tireóide, é considerado um precursor do T3 ou pró-hormônio. A deiodinação de T4 nos tecidos periféricos (por exemplo, no fígado) leva à produção de T3 e T3 reverso (rT3). rT3 não tem atividade biológica conhecida (Choksi *et al.*, 2003), enquanto T3 efetua sua ação através da sua ligação a quatro receptores específicos, TR α 1, TR β 1, TR β 2 e TR β 3, sendo que a presença deles varia de acordo com o tecido (Harvey e Williams, 2002).

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

A principal função de T3 é a de regular o metabolismo de carboidratos e proteínas em todas as células. Assim, alterações no nível plasmático de T3 podem afetar todos os órgãos e sistemas orgânicos, com efeitos importantes sobre os sistemas cardiovascular, nervoso, imunológico e genital. O efeito dos hormônios tireoidianos sobre a função reprodutiva e sobre a fertilidade e o desenvolvimento fetal têm sido amplamente investigado, por meio da avaliação dos resultados adversos encontrados em indivíduos com disfunções da tireóide e pela indução experimental dessas disfunções em animais de laboratório (Choksi *et al.*, 2003).

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

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

As deiodinases presentes na placenta humana e de roedores rapidamente metabolizam T4 materno para T3 para ser usado pelo feto, mas uma quantidade significativa de T4 também é transferida para o feto (Chan e Kilby, 2000). A placenta é livremente permeável ao iodeto e ao TRH, mas não ao TSH. Propõe-se que o TRH materno transferido ao feto possa ter participação importante no controle da função tireoidiana fetal antes da maturação completa do sistema hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano. Já está comprovado que as isoformas do receptor tireoidiano estão presentes na placenta e sua expressão

aumenta com a idade fetal (Chan e Kilby, 2000; Leonard e Koehrlé, 2000). Em humanos, ao final do primeiro trimestre de gestação, a concentração sérica materna de gonadotropina coriônica humana (hCG), produzida pela placenta, é suficiente para se ligar ao receptor para TSH e estimular parcialmente a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano materno. A ativação do receptor para TSH pela hCG estimula a síntese de T4, diminui os níveis séricos de TSH e aumenta os níveis de T4 livre, efeito que é agravado por gestações gemelares (Choksi *et al.*, 2003).

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

Assim, devido a influência dos hormônios tireoidianos na função normal de diversos tecidos e órgãos, as disfunções da tireóide estão associadas a várias alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, incluindo os distúrbios reprodutivos e do desenvolvimento em seres humanos e animais de laboratório (Choksi *et al.*, 2003). Três categorias de disfunção da tireóide são caracterizadas em humanos adultos: o hipotireoidismo subclínico, o hipotireoidismo clínico e o hipertireoidismo. O hipotireoidismo subclínico é caracterizado por uma concentração discretamente elevada de TSH, concentrações séricas normais de T3 e T4 e ausência ou presença discreta de sinais clínicos (Ross, 2000). Já o hipotireoidismo clínico é a desordem clínica mais comum da tireóide (Braverman e Utiger,

2000). Ele se caracteriza por uma concentração sérica elevada de TSH e baixa concentração sérica de T4 livre com sinais clínicos significativos.

O hipotireoidismo clínico tem a baixa ingestão de iodo como uma das suas principais causas. No entanto, em áreas onde a ingestão de iodo é adequada, a causa mais comum do hipotireoidismo é a tireoidite de Hashimoto, uma doença auto-imune causada por auto-anticorpos contra a peroxidase tireoidiana. Outras doenças auto-imunes e a radiação também são causas de hipotireoidismo. O hipertireoidismo, também conhecido como tireotoxicose se caracteriza pelo aumento sérico de T3 e T4 e redução dos níveis de TSH. A causa mais comum do hipertireoidismo é a doença de Graves, na qual há produção de anticorpos tireoestimulantes (Choksi *et al.*, 2003).

A prevalência de hipotireoidismo nas mulheres em idade reprodutiva e durante a gestação é de aproximadamente 0,3 a 2,5% (Idris *et al.*, 2005). Sua incidência está associada ao atraso do início da puberdade (Styne, 1991), anovulação, cistos ovarianos, irregularidade menstrual (Poppe e Glinoe, 2003), infertilidade, aumento da frequência de abortos espontâneos (Longcope, 1991) e nascimento de neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (Krassas, 2000). Os efeitos do hipotireoidismo sobre o desenvolvimento pós-natal do sistema genital das fêmeas de ratos e humanos apresentam resultados conflitantes. O hipotireoidismo pode levar a um atraso na maturação sexual. Por outro lado, em alguns casos, o hipotireoidismo tem sido associado à puberdade precoce e galactorrêia. Hipotireoidismo fetal parece não afetar o desenvolvimento do sistema genital feminino (Krassas, 2000).

Em espécies animais como caprinos, caninos e eqüinos, o hipotireoidismo também tem sido apontado como uma das endocrinopatias mais freqüentes e que

também resulta em distúrbios reprodutivos (Piosik *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2002). Foi verificado em ratas que a hipofunção tireoidiana influencia a maturação folicular do ovário (Maruo *et al.*, 1987) inibindo a foliculogênese e reduzindo as taxas de ovulação (Oliveira *et al.*, 2005), altera a morfologia uterina (Inuwa e Williams, 1996; Silva *et al.*, 2004) e a secreção de gonadotropinas e resulta em irregularidade do ciclo estral (Hatsuta *et al.*, 2004).

Os hormônios da tireóide agem no útero regulando a responsividade desse órgão ao estrógeno (Gardner *et al.*, 1978), de modo que o hipotireoidismo diminui a taxa proliferativa das células epiteliais, do estroma e do miométrio por reduzir a resposta das células uterinas ao estrógeno (Kirkland *et al.*, 1981). Também foi verificado que o fator de transcrição Pitx-2 pode estar envolvido no mecanismo de disfunção ovariana causada pelo hipotireoidismo, já que esse fator é importante para a síntese de colágeno ovariano (Ghosh *et al.*, 2007) e que esta síntese está diminuída no hipotireoidismo (Saha *et al.*, 2005). O efeito do hipotireoidismo sob a proliferação das células da granulosa também tem sido estudado e parece que esse efeito é dependente do estágio de desenvolvimento folicular, já que há pesquisadores que demonstram que o hipotireoidismo não altera a proliferação das células da granulosa de folículos antrais (Dijkstra *et al.*, 1996), mas reduz a proliferação das células da granulosa de folículos não antrais (Silva *et al.*, 2004).

Em relação ao desenvolvimento feto-placentário, alguns estudos já demonstraram que o hipotireoidismo pode afetar diretamente a taxa de concepção por prejudicar a decidualização durante a implantação (Galton *et al.*, 2001), por alterar os estoques de glicogênio placentário (Shafir *et al.*, 1994) e por afetar a expressão

de *c-fos* e *c-jun* em ratas gestantes hipotireóideas. Expressão anormal de *c-fos* e *c-jun*, que estão associados com a diferenciação (Morrish *et al.*, 1997) e a proliferação trofoblástica (Leonard *et al.*, 1999), respectivamente, pode estar relacionada à disfunção placentária, uma vez que a expressão desses fatores está elevada na placenta de mulheres com pré-eclampsia ou com restrição do crescimento intra-uterino (Faxen *et al.*, 1997). Embora o hipotireoidismo materno influencie o crescimento feto-placentário em ratas, o resultado vai depender do tempo de início do quadro em relação à concepção e do grau de hipotireoidismo. A tireoidectomia de ratas antes da gestação não tem nenhum efeito sobre o crescimento placentário, mas retarda o crescimento fetal nos quadros de hipotireoidismo moderado ou acentuado, transiente ou permanente (Morreale de Escobar *et al.*, 1985; Leonard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 1999). Já a indução de hipotireoidismo materno moderado ou acentuado, logo após a concepção, retarda permanentemente o crescimento fetal e placentário (Porterfield *et al.*, 1975; Bonet e Herrera, 1988; Hendrich e Porterfield, 1992; Pickard *et al.*, 2003).

Algumas pesquisas demonstraram que o hipotireoidismo aumenta os níveis de prolactina em modelos animais experimentais (Jahnke *et al.*, 1980; Reymond *et al.*, 1987). A expressão do TRH, que regula tanto a secreção do TSH como as secreções de prolactina, pode ser influenciada pela tireoidectomia. A prolactina é um hormônio luteotrópico (LTH) no roedor (Rothchild, 1981) e que estimula a síntese de progesterona. Além disso, aumento nos níveis de prolactina inibe a secreção normal de LH no ser humano (Cheung, 1983), e reduz a resposta da hipófise ao hormônio liberador de LH (LHRH) em ratos (Stradtman, 1993). A diminuição da síntese da 20 α -diidroxiprogesteronona também foi mostrada em ratas com hipotireoidismo (Mattheij *et*

al., 1995). O prolongamento da fase luteal induzida pela supressão do catabolismo da progesterona pode manter altos níveis de progesterona. A elevação dos níveis de progesterona afeta negativamente a secreção de gonadotropina pelo hipotálamo e pela hipófise, resultando em diminuição dos níveis de gonadotropina basal (LH e FSH) (Taya e Sasamoto, 1989). A redução dos níveis de estradiol em ratas com hipotireoidismo pode ser devido a diminuição na capacidade de resposta das células da granulosa do ovário ao FSH (Maruo *et al.*, 1987), ou inibição da secreção de FSH induzida pelos níveis elevados de progesterona (Hatsuta *et al.*, 2004).

Em ratas virgens hipotireóideas, diminuição dos níveis séricos de corticosterona, hormônio do crescimento e da concentração de IGF-I foram observados, assim como períodos prolongados de diestro, que correspondeu a pseudogestação, demonstrado pelo aumento das concentrações séricas de progesterona e prolactina (Hapon *et al.*, 2007). Ratas tratadas com droga anti-tireoidiana também apresentam atraso no parto e redução do número de filhotes. É interessante notar que ratas gestantes hipertireóideas apresentam parto prematuro causado por luteólise prematura, ao contrário de ratas hipotireóideas que tem prolongamento da fase luteal (Rosato *et al.*, 1998).

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

Os efeitos do hipertireoidismo no desenvolvimento pós-natal do sistema genital das fêmeas também são inconsistentes. Algumas pesquisas demonstram que o hipertireoidismo antes da puberdade causa atraso da menstruação, enquanto outras não demonstram nenhum efeito significativo sobre a menarca. Estudos epidemiológicos de mulheres com hipertireoidismo mostram aumento na incidência de oligomenorréia ou amenorréia (Krassas, 2000). E como acontece no hipotireoidismo, o hipertireoidismo fetal não parece afetar o desenvolvimento do sistema genital de fêmeas (Krassas, 2000).

alterar o número e o desenvolvimento dos fetos (Souza *et al.*, 2010).

Em uma seqüência de estudos já realizados em modelos animais, foi demonstrado que o hipertireoidismo aumenta a eficiência reprodutiva, com aumento da foliculogênese ovariana, da taxa de ovulação e da taxa de concepção sem alterar a viabilidade fetal (Serakides *et al.*, 2001a; Serakides *et al.*, 2001b; Oliveira *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que a administração de tiroxina a ratas gestantes causa alterações placentárias importantes no que concerne à proliferação e apoptose celular. Essas alterações poderiam ser responsáveis pelo aumento da taxa de concepção sem alterar a viabilidade fetal (Freitas *et al.*, 2007). O hipertireoidismo também induz modificações significativas no útero de ratas pré-púberes. Ele aumenta significativamente a espessura da parede uterina e, após a maturidade sexual, essas modificações ocorrem tanto no útero quanto na tuba uterina em intensidade variável e dependente da fase do ciclo estral (Oliveira *et al.*, 2005). Esses achados indicam que tais mudanças no útero de ratas hipertireóideas podem dar maior suporte ao incremento da foliculogênese com conseqüente aumento da taxa de gestação, já que foi relatado também que ratas gestantes hipertireóideas parem maior número de filhotes (Rosato *et al.*, 1992). Em marrãs, o hipertireoidismo aumenta a expressão de VEGF placentário e a angiogênese uterina, sem, no entanto,

CAPITULO 2

Atividade proliferativa, angiogênica e apoptótica e expressão da cicloxigenase-2 no ovário de ratas com disfunções tireoidianas

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para a função reprodutiva normal. Eles podem atuar diretamente no ovário (Mauro *et al.*, 1992), através de receptores específicos, como também indiretamente por meio de múltiplas interações com os hormônios sexuais (Poppe *et al.*, 2008).

Pelo fato do hipotireoidismo ser uma das endocrinopatias mais associadas com subfertilidade ou infertilidade e com transtornos do ciclo menstrual na mulher, seus efeitos vêm sendo amplamente estudados ao longo de vários anos em modelos animais pré-púberes e púberes (Fitko e Szlezzyngier, 1994; Mattheij *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2007). Mas até o presente momento, muitos mecanismos pelos quais a hipofunção tireoidiana afeta a reprodução precisam ser elucidados. Apesar de o hipertireoidismo causar desordens do ciclo menstrual na mulher (Attia *et al.*, 2007) e estimular a atividade ovariana em ratas, por reduzir a atresia folicular e aumentar a ovulação (Serakides *et al.*, 2001a), seus efeitos sobre os mecanismos que controlam o crescimento e a atresia folicular, a ovulação e a formação e regressão do corpo lúteo também não tem sido descritos.

Em condições normais, o ovário sofre extensas mudanças morfológicas e funcionais durante cada ciclo reprodutivo. Desenvolvimento e atresia folicular, ovulação e formação e regressão do corpo

lúteo envolvem um número complexo de processos celulares que incluem proliferação, diferenciação e migração celular, angiogênese e apoptose (Simpson *et al.*, 2001; Curry e Osteen, 2003). Durante esses eventos, as células da granulosa, da teca e luteínicas estão sob estímulo das gonadotropinas e de vários fatores de crescimento (Saha *et al.*, 2005). Uma das hipóteses deste estudo é de que o hipo e o hipertireoidismo afetam de forma diferenciada a atividade proliferativa e apoptótica das células da granulosa, o que explicaria a redução da foliculogênese em animais com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2004) e o aumento da foliculogênese no hipertireoidismo (Serakides *et al.*, 2001a).

A angiogênese também é um fator crucial para o crescimento folicular e formação do corpo lúteo, uma vez que sua deficiência tem sido apontada como importante causa de subfertilidade (Ebisch *et al.*, 2008), particularmente pela baixa expressão do VEGF (Reynolds *et al.*, 2005). Apesar disso, o envolvimento do VEGF nas alterações ovarianas causadas pelas disfunções tireoidianas não tem sido estudado.

A ovulação é outra fase do ciclo dependente da ação sinérgica de vários fatores e de eventos bioquímicos e biofísicos que culminam na ruptura do folículo e na liberação do gameta. Esse evento é dependente da ação das prostaglandinas, produto da ação da COX-2. Após a ovulação, o folículo sofre luteinização, caracterizada pelo início da secreção de progesterona pelas células da granulosa. Todos esses eventos também estão sob a influência do VEGF, que vai atuar em sinergismo com a COX-2 na angiogênese, esteroidogênese e na formação e manutenção do corpo lúteo (Kaczmarek *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2008).

Caso não haja gestação, o corpo lúteo regride por luteólise caracterizada por

apoptose das células luteínicas (Guo *et al.*, 1998). Com exceção dos folículos primordiais e primários, os folículos ovarianos que não ovulam também entram em atresia por apoptose celular intensa. Outra hipótese é que o aumento da atresia folicular no hipotireoidismo possa ser mediado pela redução da expressão de VEGF, e que, ao contrário, a redução da atresia folicular em animais com hipertireoidismo seja mediada por aumento da expressão desse fator de crescimento.

Sob condições fisiológicas, todo esse complexo mecanismo e suas interações, que controlam o desenvolvimento folicular até a ovulação e formação do corpo lúteo, é bastante estudado, particularmente em ovários de ratas e camundongos que se constituem nos principais modelos animais para comparação com a espécie humana. No entanto, os mecanismos pelos quais o hipo e o hipertireoidismo alteram a foliculogênese e a ovulação têm sido pouco estudados. Por isso, o objetivo deste trabalho é estudar a atividade proliferativa, apoptótica e angiogênica e a expressão da COX-2 em ovários de ratas com disfunções tireoidianas. O estudo desses mecanismos pode ser importante não somente para esclarecer o porquê da subfertilidade ou infertilidade decorrente do hipotireoidismo, como também para estabelecer estratégias de tratamento das infertilidades a partir do conhecimento dos mecanismos pelos quais o hipertireoidismo aumenta o desempenho reprodutivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura do Laboratório de Experimentação Animal e do Laboratório de Histopatologia e Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de

Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 129/2009) (Anexo 1). O projeto contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 472022/2008-3).

Indução das disfunções tireoidianas

Foram utilizadas 36 ratas Wistar adultas com dois meses de idade. As ratas foram alojadas em caixas plásticas (seis ratas por caixa) e receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, 22% de proteína e micronutrientes em concentrações recomendadas) e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de adaptação de sete dias, as ratas foram divididas em três grupos: hipotireóideo (n=12), hipertireóideo (n=12) e controle (n=12). O hipotireoidismo foi induzido pela administração de 6-propyl-2-thiouracil¹ (1mg/animal) diluído em 5mL de água destilada. Para a indução do hipertireoidismo foi realizada a administração de L-tiroxina² (50µg/animal) diluída em 5mL de água destilada. O grupo controle (eutireóideo) recebeu 5mL de água destilada como placebo. Todos os grupos receberam o tratamento descrito anteriormente por sonda orogástrica, diariamente, durante três meses. As doses de tiroxina e propiltiouracil e o tempo de duração do tratamento foram adotados pelo fato de serem dose e tempo suficientes para a indução de hiper e hipotireoidismo, respectivamente, e para a indução de distúrbios da foliculogênese e ovulação (Serakides *et al.*, 2001a, Silva *et al.*, 2004).

¹ P3755; Sigma, St Louis, MO, USA.

² T2376; Sigma, St Louis, MO, USA

Ao final de cada tratamento, as ratas foram submetidas à citologia vaginal para determinação da fase do ciclo estral segundo Marcondes *et al.* (2002). As ratas foram eutanasiadas com sobredose da associação de quetamina com xilazina intramuscular e foram distribuídas igualmente nas fases de proestro-estro ou metaestro-diestro, dentro de cada grupo. Assim, foram formados seis grupos: 1) hipotireóide proestro-estro (n=6), 2) hipotireóide metaestro-diestro (n=6), 3) hipertireóide proestro-estro (n=6), 4) hipertireóide metaestro-diestro (n=6), 5) controle proestro-estro (n=6) e 6) controle metaestro-diestro (n=6).

Dosagem plasmática de T4 livre

Após anestesia com xilazina e quetamina, as ratas foram submetidas à colheita de sangue por punção intracardíaca. O sangue foi colhido em tubos com heparina para obtenção de plasma e armazenado a -20°C para dosagem de T4 livre. A dosagem de T4 livre foi realizada pela técnica de quimioluminescência (Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA) em sistema totalmente automático e de acordo com as recomendações do fabricante dos kits. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 4% e 7%, respectivamente.

Necropsia e processamento histológico

Durante a necropsia foram colhidas as tireóides e todo o sistema genital (ovários, tuba uterinas, útero e vagina). As tireóides e ovários foram dissecados e pesados. Apesar de o ovário ser o principal alvo deste estudo, todo o sistema genital foi colhido com o objetivo de confirmar a fase do ciclo estral estabelecida pelo esfregaço vaginal corado por hematoxilina-eosina. Todos os órgãos foram fixados em formalina 10% neutra e tamponada por 24 horas. Eles foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, submetidos à

microtomia com cortes de 4µm e corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE).

Secções histológicas de útero e vagina foram avaliadas juntamente com o ovário para a classificação das fases do ciclo estral de acordo com o critério preconizado por Westwood (2008).

Análise imunoistoquímica

Para a realização da imunoistoquímica e da técnica de túnel foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura do ovário esquerdo ou direito em lâminas silanizadas. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-VEGF, anti-Flk-1, anti-COX-2 e anti-CDC47.

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando solução Retrieval (Anexo 2). As lâminas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário (Tab. 1) e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio e estreptavidina peroxidase. A incubação com anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi o DAB e o tempo de incubação variou de acordo com o anticorpo primário (Tab. 1). As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

A avaliação da imunomarcção foi realizada nos folículos ovarianos e no corpo lúteo, de acordo com o padrão de expressão de cada marcador. A identificação de cada folículo e a caracterização dos corpos lúteos segundo o seu estágio de desenvolvimento (jovem, maduro e regressão) foram realizadas de acordo com Freeman (1994) e Westwood (2008), respectivamente.

Para todos os anticorpos foi avaliada a expressão nas seguintes estruturas do ovário: nas células da granulosa e da teca de folículos e nas células luteínicas. A exclusão dos folículos primários nessas análises se deve ao fato de a expressão desses fatores neles ser fraca ou nula (Oktay et al., 1995; Smith et al., 2002; Celik-Ozenci et al., 2003; Sirois et al., 2004). A expressão do CDC-47 também foi avaliada nas células endoteliais e do pericito presentes no corpo lúteo.

Nos folículos pré-antrais e terciário inicial, a expressão de CDC-47 foi determinada nas células da granulosa em todas as fases do ciclo estral. O valor foi dado em porcentagem considerando-se o número de células marcadas em relação ao número total de células de cada camada. Nos folículos terciários em estágio final e nos folículos pré-ovulatórios, a porcentagem de células da granulosa com expressão de CDC-47 foi determinada em uma população de 100

células. Foi determinada a média da expressão de CDC-47 em cinco estruturas ovarianas de cada estágio folicular por animal. Não foi realizada a contagem em folículo pré-ovulatório por ser pouco presente nas seções histológicas, principalmente no grupo hipotireóideo (Silva et al.; 2004).

No corpo lúteo a porcentagem de células com expressão de CDC-47 foi determinada em uma população de 500 células, diferenciando células luteínicas de células endoteliais/do pericito. A contagem foi realizada em três corpos lúteos jovens por animal na fase de metaestro-diestro. Para a quantificação foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptado a um microscópio Olympus BX-40, e utilizado o software de captura SPOT® versão 3.4.5. Para a análise das imagens foi utilizado o software *Image Pro Plus*® versão 4.5.

Tabela 1. Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempo de incubação com diaminobenzidina (DAB)

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	DAB
Anti-VEGF	Coelho/ policlonal	1:100	45 segundos
Anti-Flk1	Camundongo/ monoclonal	1:600	6 minutos
Anti-COX2	Camundongo/ monoclonal	1:100	30 minutos
Anti-CDC47	Camundongo/ monoclonal	1:200	10 minutos

A expressão de COX-2 foi quantificada em três corpos lúteos jovens e em três corpos lúteos maduros por animal, na fase de metaestro-diestro, com o uso de uma graticula de 121 pontos acoplada ao microscópio óptico. Foi avaliada a porcentagem de área com expressão para COX-2 em dois campos/corpo lúteo escolhidos aleatoriamente. A contagem foi realizada com objetiva de 40x.

Em resumo, foi avaliada a porcentagem de células que expressavam CDC-47 na camada

da granulosa e nas células luteínicas e endoteliais e do pericito do corpo lúteo. Para COX-2 foi realizada avaliação qualitativa da sua expressão nos folículos ovarianos e análise qualitativa e morfométrica da sua área de expressão nos corpos lúteos. Em relação ao VEGF e Flk-1 foi realizada avaliação qualitativa tanto nos folículos ovarianos como nos corpos lúteos.

Avaliação da técnica de túnel

Células apoptóticas nos folículos atrésicos e corpos lúteos foram marcadas pela técnica de túnel utilizando o *TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit*¹ (Anexo 3). A recuperação antigênica foi realizada de forma enzimática com Proteinase K por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C com o *TdT* por 1 hora e 30 minutos e por 30 minutos à temperatura ambiente nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e estreptavidina. O cromógeno utilizado foi o DAB e o tempo de incubação foi de 15 minutos. As secções foram contra-coradas com *methyl green*. O controle negativo foi obtido pela substituição do *TdT* por TBS. Como controle positivo foi utilizado ovário com folículos atrésicos.

No corpo lúteo, a quantificação do número de células apoptóticas foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 40× em quatro campos. Foi obtida a média de todos os corpos lúteos presentes na secção histológica, sem diferenciar o seu estágio de desenvolvimento. Nos folículos, somente foi realizada avaliação morfológica sem quantificação.

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com fatorial 3x2, sendo três grupos (hipotireóideo, hipertireóideo e controle) e dois subgrupos (proestro-estro e metaestro-diestro). Foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *Student Newman Keuls* (SNK). Diferenças significativas foram consideradas se $P < 0,05$.

RESULTADOS

Indução das disfunções tireoidianas

A indução do hipo e do hipertireoidismo foi comprovada pela concentração plasmática de T4 livre e pela sintomatologia. As ratas tratadas com propiltiouracil apresentaram níveis de T4 livre significativamente menores do que os do grupo controle (Tab. 2) e sinais clínicos caracterizados por letargia e alopecia. No entanto, as ratas tratadas com tiroxina apresentaram níveis plasmáticos de T4 livre significativamente maiores do que os do grupo controle (Tab. 2) e sinais clínicos caracterizados por agressividade, exoftalmia, polifagia e polidipsia.

As tireóides apresentaram peso e morfologia distintos dependendo do grupo experimental. As tireóides das ratas hipotireóideas apresentaram peso significativamente maior em comparação ao grupo controle. O tratamento com tiroxina não alterou o peso das tireóides e, em nenhum grupo, o peso das tireóides sofreu influência das fases do ciclo estral (Tab. 3).

Morfologicamente, a tireóide dos animais controle apresentava folículos redondos ou ovais, de tamanhos variados, revestidos, na sua maioria, por epitélio cuboidal baixo e com grande quantidade de colóide. Nos animais tratados com propiltiouracil, a tireóide apresentava bócio parenquimatoso com adenomatose intra e interfolicular caracterizados pela presença de folículos pequenos revestidos por epitélio cuboidal alto com projeções papilares para o lúmen e com pouco colóide. Havia também aglomerados de células foliculares desprovidos de lúmen. Em contrapartida, a tireóide das ratas tratadas com tiroxina apresentava folículos de tamanhos variados revestidos por epitélio achatado e com grande quantidade de colóide

¹ TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem. San Diego, CA, USA

Tabela 2. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da concentração plasmática de T4 livre os grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.

Variável	Grupo		
	Controle	Hipotireóideo	Hipertireóideo
T4 livre (ng)	1,699±0,423 B	0,029±0,047 C	4,179±0,927 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 3. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso da tireóide dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.

Grupo	Variável
	Peso da Tireóide (g)
Proestro-estro	
Controle	0,014 ± 0,002 B
Hipotireóideo	0,039 ± 0,008 A
Hipertireóideo	0,012 ± 0,003 B
Metaestro-diestro	
Controle	0,012 ± 0,004 B
Hipotireóideo	0,041 ± 0,008 A
Hipertireóideo	0,011 ± 0,004 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Expressão imunoistoquímica de CDC-47

Os animais do grupo controle, hipotireóideo e hipertireóideo, tanto na fase de proestro-estro como no metaestro-diestro, apresentaram expressão de CDC-47 em todos os estágios do desenvolvimento folicular (Fig. 1), não sendo observada diferença significativa entre os grupos (Tab. 4). Os folículos primordiais tinham expressão de CDC-47 somente nos ovócitos, enquanto os folículos primários apresentaram fraca expressão de CDC-47 nas células da granulosa. A atividade proliferativa das células da granulosa aumentou dos folículos pré-antrais para os antrais, demonstrado pela maior expressão de CDC-47, principalmente nos folículos terciários em estágio mais avançado de desenvolvimento que apresentavam quase 100% de expressão nas células da granulosa

(Tab. 4). Os folículos em atresia também apresentaram redução da expressão de CDC-47 na camada da granulosa e da teca interna, sendo essa redução maior nos estágios mais avançados de atresia (Fig. 1).

Já os corpos lúteos dos três grupos experimentais apresentaram diferenças quanto à taxa proliferativa das células luteínicas e endoteliais/pericito segundo o estágio de desenvolvimento luteal, tanto na fase de proestro-estro como no metaestro-diestro.

Independentemente do grupo experimental, o corpo lúteo em formação, ou seja, imediatamente após a ovulação, apresentou alta taxa proliferativa das células luteínicas, diferente do corpo lúteo jovem que apresentou redução da expressão de CDC-47 em células luteínicas e aumento nas células

do pericito e endoteliais. Já no corpo lúteo maduro, a taxa proliferativa foi menor em relação ao corpo lúteo jovem, com redução mais intensa no corpo lúteo em regressão.

No entanto, surpreendentemente, foi verificado que o corpo lúteo jovem dos animais hipotireóides apresentou redução significativa na porcentagem total de células com expressão de CDC-47 e,

particularmente, na porcentagem de células endoteliais e do pericito que expressavam CDC-47. Já o hipertireoidismo não alterou a expressão de CDC-47 no corpo lúteo jovem (Tab. 5 e Fig. 2).

Tabela 4. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 na camada da granulosa dos grupos controle, hipotireóide e hipertireóide nas fases de proestro-estro e metaestro-diestro.

Variável	Grupo		
	Controle	Hipotireóide	Hipertireóide
Proestro-estro			
Fol. pré-antral	65,20 ± 20,09 A	74,93 ± 20,20 A	72,27 ± 21,12 A
Fol. terciário inicial	74,91 ± 13,02 A	82,53 ± 14,13 A	76,90 ± 14,99 A
Fol. terciário final	97,20 ± 3,77 A	97,79 ± 3,19 A	97,26 ± 4,65 A
Fol. pré-ovulatório	91,41 ± 17,31 A	94,64 ± 6,78 A	81,31 ± 23,24 A
Metaestro-diestro			
Fol. pré-antral	63,79 ± 19,28 A	66,89 ± 23,20 A	74,32 ± 12,37 A
Fol. terciário inicial	78,48 ± 8,98 A	86,26 ± 16,44 A	80,52 ± 12,09 A
Fol. terciário final	94,20 ± 6,96 A	97,33 ± 2,55 A	95,46 ± 7,88 A
Fol. pré-ovulatório	97,00 ± 4,14 A	98,84 ± 2,83 A	94,89 ± 2,63 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 5. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células do corpo lúteo jovem com expressão de CDC-47 dos grupos controle, hipotireóide e hipertireóide na fase de metaestro-diestro.

Variável	Grupo		
	Controle	Hipotireóide	Hipertireóide
Total de células com expressão de CDC-47	21,83 ± 5,482 A	13,56 ± 6,131 B	18,05 ± 6,577 A
Células luteínicas com expressão de CDC-47	9,28 ± 2,171 A	8,90 ± 5,789 A	7,30 ± 3,178 A
Células endoteliais/pericito com expressão de CDC-47	54,48 ± 14,480 A	30,26 ± 24,268 B	43,67 ± 13,961 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

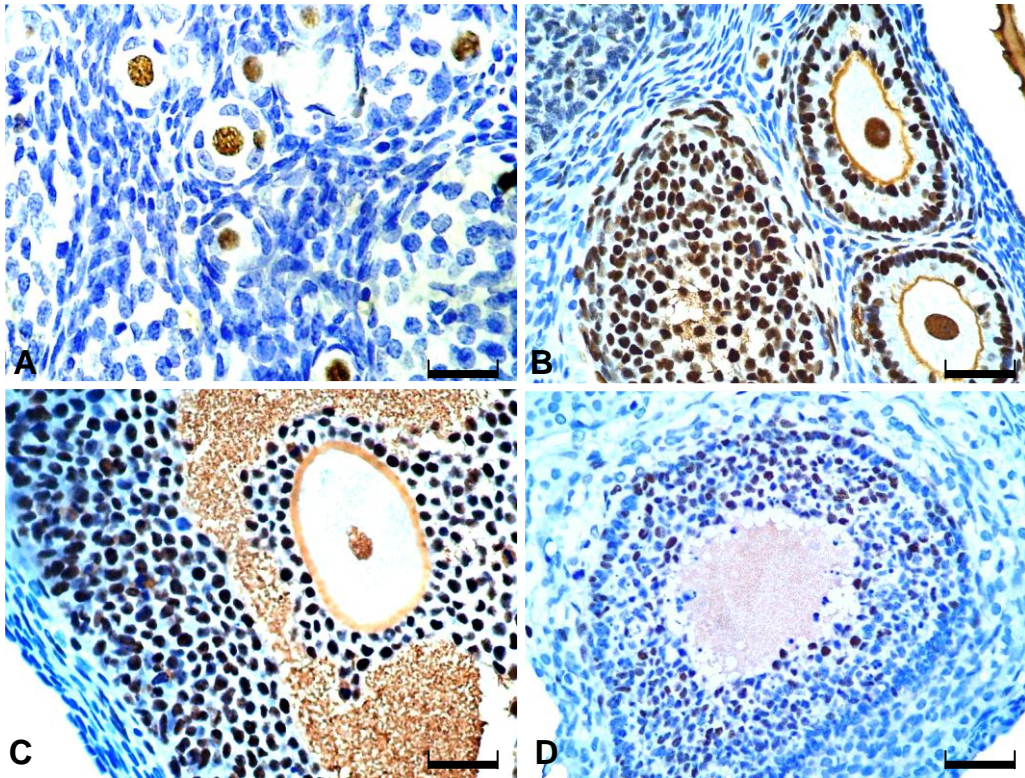


Figura 1. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B, C e D) Folículo primordial, secundário (seta), terciário e atrésico, respectivamente. Expressão de CDC-47 nas células da granulosa e na camada da teca durante o desenvolvimento folicular. Redução acentuada da expressão de CDC-47 no folículo atrésico (D). As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo corado em marrom; A, Barra= 2,7 μ m. C, Barra= 3,3 μ m. B e D, Barra= 4 μ m.

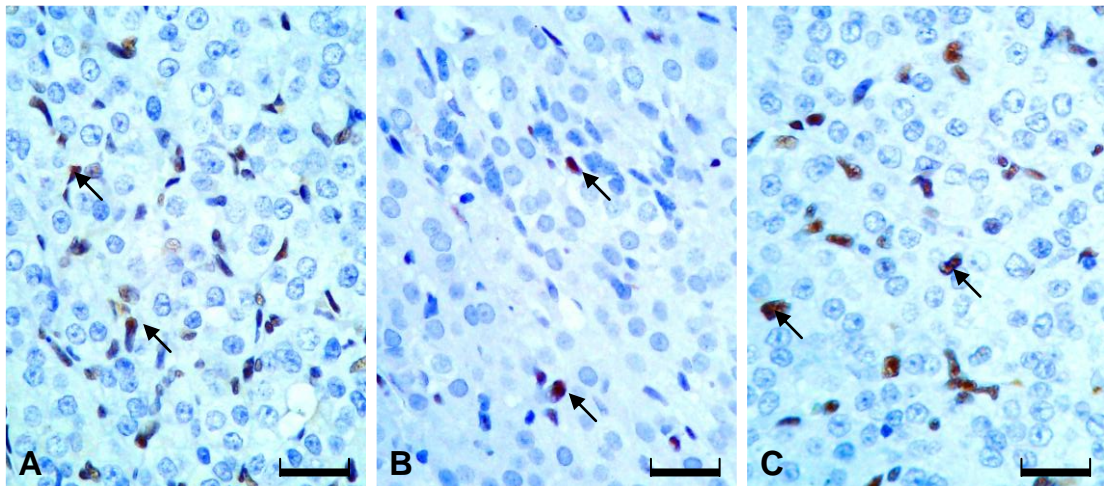


Figura 2. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóide e hipertireóide, respectivamente. Redução acentuada do número de células marcadas por CDC-47 no corpo lúteo jovem do grupo hipotireóide em relação ao controle. Grupo hipertireóide semelhante ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam o núcleo corado em marrom (seta); Barra= 2,9 μ m.

Quantificação de corpos apoptóticos

Nos três grupos experimentais, o número de corpos apoptóticos variou nos folículos atrésicos de acordo com o estágio de atresia, sendo maior nos folículos em estágio mais avançado de atresia. Os corpos apoptóticos foram observados principalmente em folículos terciários (Fig. 3), sendo que a presença deles em folículos primários, secundários e pré-ovulatórios era fraca (menos de três corpos apoptóticos) ou ausente.

Em relação aos corpos lúteos, os três grupos experimentais apresentaram variação no número de corpos apoptóticos de acordo com o estágio do desenvolvimento luteal. Os corpos apoptóticos eram mais visíveis no corpo lúteo maduro, seguido pelo corpo lúteo em regressão e ausente no corpo lúteo

jovem. Exceto no grupo hipotireóideo, o número de corpos apoptóticos foi significativamente maior nos corpos lúteos da fase de proestro-estro em comparação à fase de metaestro-diestro.

Embora nos grupos controle e hipertireóideo, o número de células luteínicas em apoptose tenha sido maior na fase de proestro-estro, nos animais hipotireóideos o número de corpos apoptóticos foi muito baixo no corpo lúteo independentemente da fase do ciclo estral, tendo sido significativamente menor em comparação ao controle na fase de proestro-estro (Tab.6). Ao contrário, os animais hipertireóideos apresentaram aumento significativo do número de corpos apoptóticos no corpo lúteo independentemente da fase do ciclo estral (Tab.6 e Fig. 4).

Tabela 6. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo no corpo lúteo dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo nas fases de proestro-estro e metaestro-diestro.

Grupo	Nº de corpos apoptóticos
Proestro-estro	
Controle	6,676±5,697 B
Hipotireóideo	0,979±1,199 D
Hipertireóideo	11,583±7,321 A
Metaestro-diestro	
Controle	1,029±1,456 D
Hipotireóideo	0,405±0,661 D
Hipertireóideo	3,302±3,613 C

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

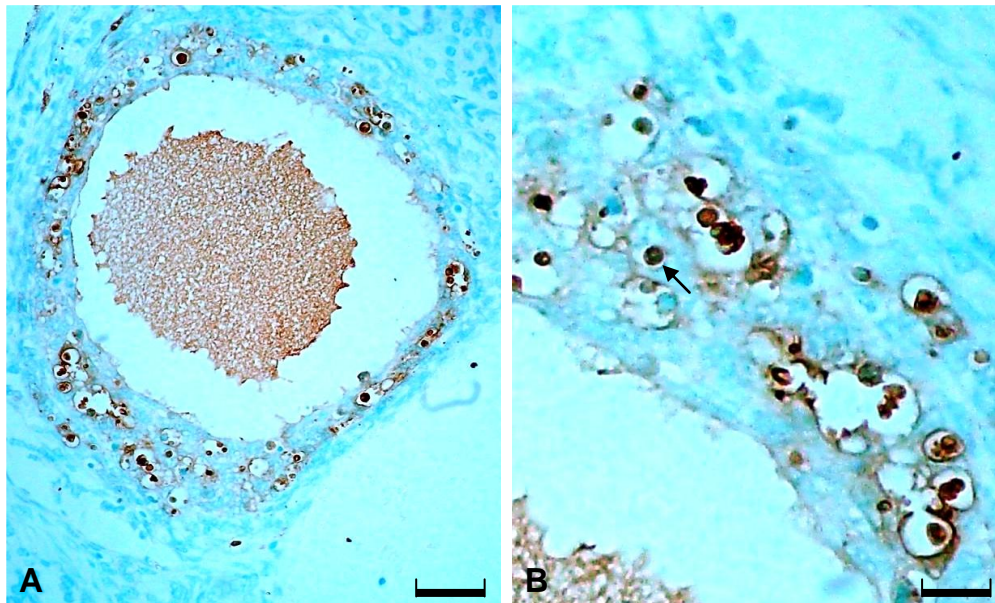


Figura 3. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Técnica de túnel, contra-coloração pelo *Metil green*. A) Marcação dos corpos apoptóticos na camada da granulosa em folículo terciário atrésico, Barra= 3,4 μ m. B) Maior aumento da marcação dos corpos apoptóticos (seta) na camada da granulosa, Barra= 1,7 μ m. Os corpos apoptóticos apresentam-se corados em marrom.

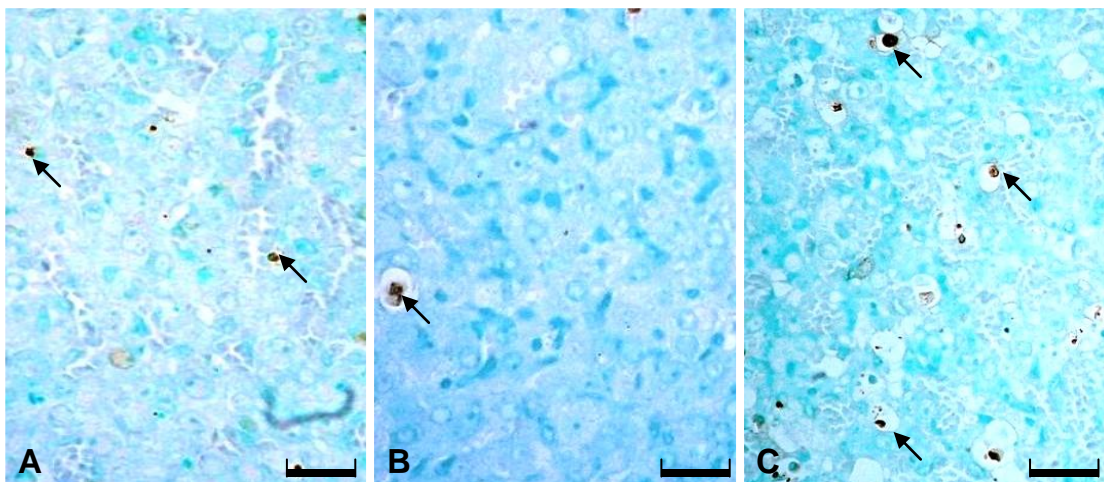


Figura 4. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Técnica de túnel, contra-coloração pelo *Metil green*. A, B e C) Grupos controle, hipotireóide e hipertireóide, respectivamente. Redução intensa do número de corpos apoptóticos (setas) no corpo lúteo do grupo hipotireóide (B) em relação ao controle (A). Grupo hipertireóide (C) com maior número de corpos apoptóticos no corpo lúteo em comparação ao controle (A). Os corpos apoptóticos apresentam-se corados em marrom; Barra= 5,4 μ m.

Expressão imunoistoquímica de VEGF e FLK-1

O grupo controle apresentou expressão de VEGF em todos os folículos em desenvolvimento com exceção do folículo primordial. Não houve variação no padrão de expressão entre os grupos experimentais. Havia expressão citoplasmática de VEGF tanto nas células da granulosa como na camada da teca, sendo que algumas células da granulosa de folículos secundários, terciários e pré-ovulatórios apresentavam expressão nuclear de VEGF, particularmente nas células mais próximas ao ovócito. Também foi observado aumento na intensidade de expressão de VEGF com o avançar do desenvolvimento folicular, sendo que os folículos em atresia apresentaram a menor expressão de VEGF (Fig. 5).

Já nos corpos lúteos, a expressão de VEGF nos três grupos experimentais variou de acordo com o estágio do desenvolvimento luteal. O número de células luteínicas com expressão de VEGF reduziu com o avançar do desenvolvimento do corpo lúteo, ou seja, o número de células com expressão desse fator era maior no corpo lúteo jovem em relação ao maduro. No corpo lúteo em regressão somente algumas poucas células luteínicas apresentavam forte expressão de VEGF. Interessante também é que a intensidade de expressão do VEGF no corpo lúteo foi menor na fase de metaestro-diestro em relação ao proestro-estro, nos três grupos experimentais.

Embora o grupo hipotireóideo tenha apresentado o mesmo padrão de expressão descrito anteriormente, houve aumento na intensidade de expressão de VEGF nos corpos lúteos jovens das fases de proestro-

estro e metaestro-diestro das ratas hipotireóideas em relação ao controle, o que não foi observado nos animais hipertireóideos (Fig. 6).

A expressão de Flk-1, receptor do VEGF, nos três grupos experimentais, foi semelhante nos folículos ovarianos, sendo que o padrão de expressão variou de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular. Tanto as células da granulosa como da teca apresentaram expressão citoplasmática de Flk-1, sendo que a expressão na camada da teca era homogênea e mais intensa do que na camada da granulosa. Além disso, os folículos primários, secundários e terciários iniciais apresentaram expressão de Flk-1 mais intensa na camada da granulosa do que os folículos terciários finais e pré-ovulatórios. Semelhante à expressão de VEGF, os folículos em atresia apresentaram redução intensa da expressão de Flk-1, tanto na camada da granulosa como da teca (Fig. 7).

Nos corpos lúteos, o padrão de expressão de Flk-1 não apresentou diferença aparente entre grupos. No entanto, semelhante ao VEGF, a expressão de Flk-1 variou de acordo com o estágio do desenvolvimento luteal. A expressão era citoplasmática e homogênea nas células luteínicas, com maior área de expressão de Flk-1 nos corpos lúteos jovens, embora a intensidade de expressão individual das células luteínicas fosse maior nos corpos lúteos maduros e em regressão. Interessante é que, semelhante à expressão de VEGF, a expressão de Flk-1 nas células luteínicas dos corpos lúteos maduros e em regressão foi mais intensa em comparação aos corpos lúteos mais jovens (Fig. 8).

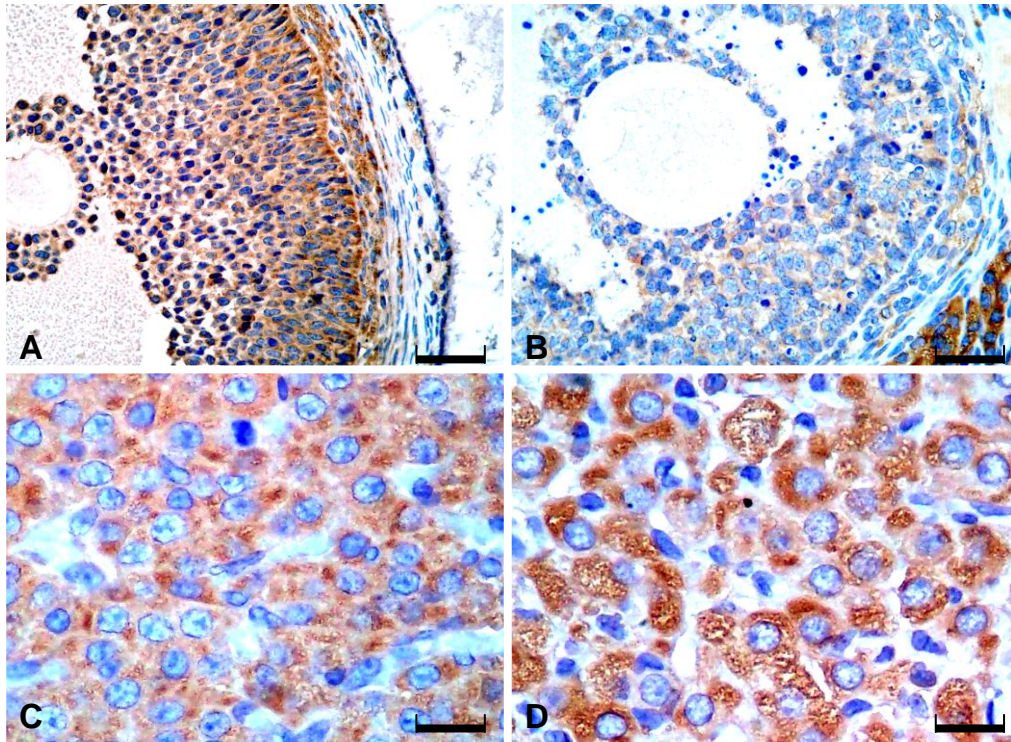


Figura 5. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Folículos terciário e atrésico, respectivamente. Redução intensa da expressão de VEGF na camada da granulosa e da teca interna do folículo atrésico em relação ao folículo terciário. C e D) Corpo lúteo jovem e maduro, respectivamente. Corpo lúteo maduro com expressão de VEGF mais intensa nas células luteínicas do que o corpo lúteo jovem. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o núcleo e/ou o citoplasma corado em marrom. A, Barra= 4,2 μ m. B, C e D, Barra= 3,4 μ m.

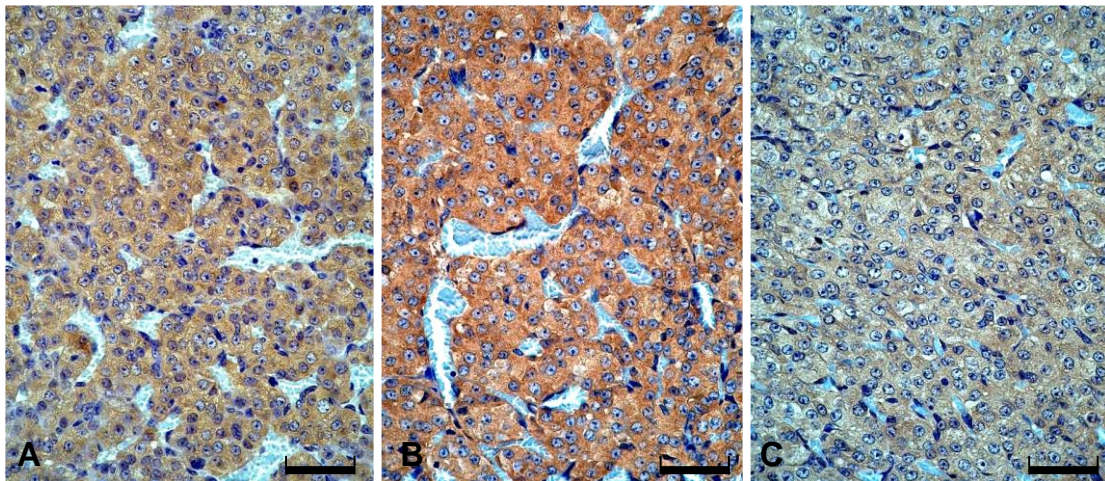


Figura 6. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo, respectivamente. Aumento da intensidade de expressão do VEGF nas células luteínicas do corpo lúteo jovem do grupo hipotireóideo em relação ao controle. Grupo hipertireóideo semelhante ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom, Barra= 5,3 μ m.

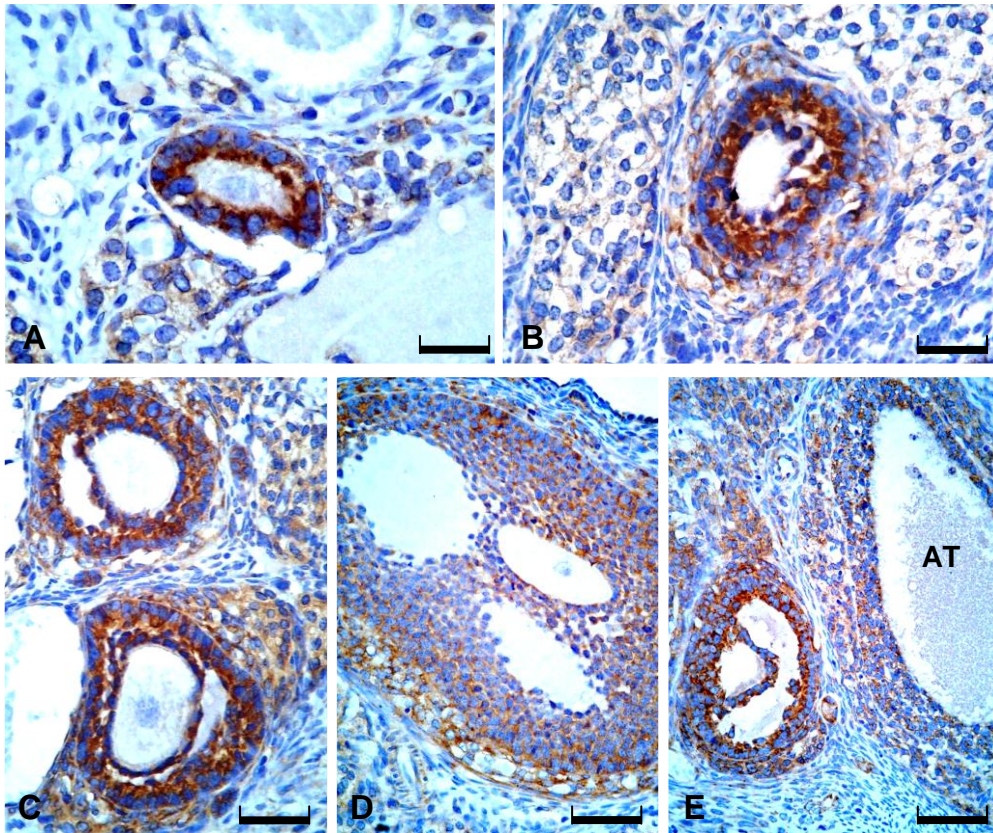


Figura 7. Ovário, rata, grupo controle, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A-E) Folículos em diferentes fases do desenvolvimento. Folículo primário (A), secundário (B), terciário inicial (C), terciário final (D) e atrésico (E). Menor expressão de Flk-1 na camada da granulosa dos folículos terciário final e atrésico (AT) em relação aos demais folículos. A, Barra= 2,3 μ m. B, Barra= 3,9 μ m. C, Barra= 8,7 μ m. D e E, Barra= 7,5 μ m.

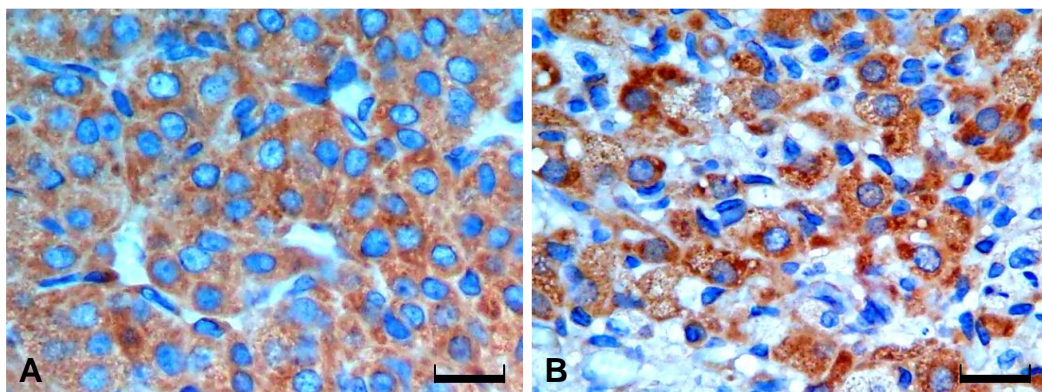


Figura 8. Ovário, rata, grupo controle, fase metaestro-diestro. A e B) Corpos lúteos jovem e em regressão, respectivamente. Corpo lúteo em regressão com expressão de Flk-1 nas células luteínicas mais intensa do que no corpo lúteo jovem. As células imunomarcadas pelo anticorpo Flk-1 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 3,6 μ m.

Expressão imunoistoquímica de COX-2

O grupo controle, hipotireóideo e hipertireóideo apresentaram expressão de COX-2 principalmente nos corpos lúteos, tanto na fase de proestro-estro como no metaestro-diestro. Nos folículos, a expressão de COX-2 foi discreta ou moderada na camada da teca de folículos terciários e pré-ovulatórios e discreta nos folículos em atresia (Fig. 9).

A expressão de COX-2 nas células luteínicas era citoplasmática e apresentava um padrão granular. A porcentagem de área com expressão de COX-2 nos corpos lúteos jovens foi significativamente maior do que

nos corpos lúteos maduros (Tab. 7). Independentemente do grupo, todos os corpos lúteos da fase de metaestro-diestro apresentaram expressão de COX-2 mais intensa do que na fase de proestro-estro.

O hipotireoidismo reduziu significativamente a porcentagem de área com expressão de COX-2 nos corpos lúteos jovens e maduros da fase de metaestro-diestro (Tab. 7) em comparação ao grupo controle (Fig. 10). O hipertireoidismo também reduziu significativamente a porcentagem de área de expressão de COX-2, mas somente nos corpos lúteos jovens da fase de metaestro-diestro (Tab. 7).

Tabela 7. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área com expressão de COX-2 nos corpos lúteos jovens e maduros da fase de metaestro-diestro dos grupos controle, hipotireóideo e hipertireóideo.

Grupo	% área com expressão de COX-2
Corpo lúteo jovem	
Controle	74,60±7,44 A
Hipotireóideo	60,36±9,81 C
Hipertireóideo	67,59±8,18 B
Corpo lúteo maduro	
Controle	49,92±4,34 D
Hipotireóideo	43,55±6,78 D
Hipertireóideo	49,69±4,31 D

*Médias com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

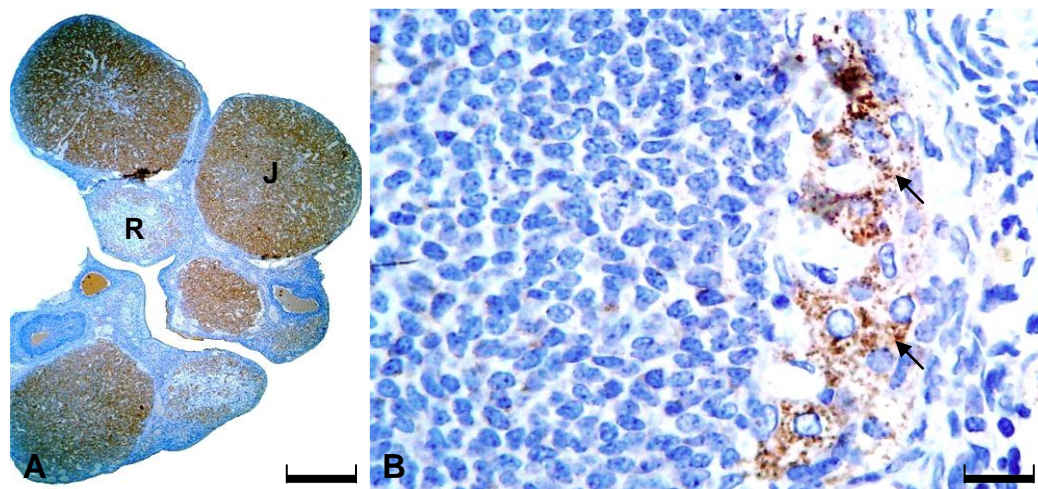


Figura 9. Rata, grupo controle, ovário, fase proestro-estro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A) Visão panorâmica do ovário com expressão de COX-2 principalmente nos corpos lúteos e redução da expressão nos corpos lúteos em regressão (R) em relação ao corpo lúteo jovem (J), Barra= 87,6 μ m. B) Expressão de COX-2 na camada da teca interna (seta), Barra= 1,5 μ m. As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom.

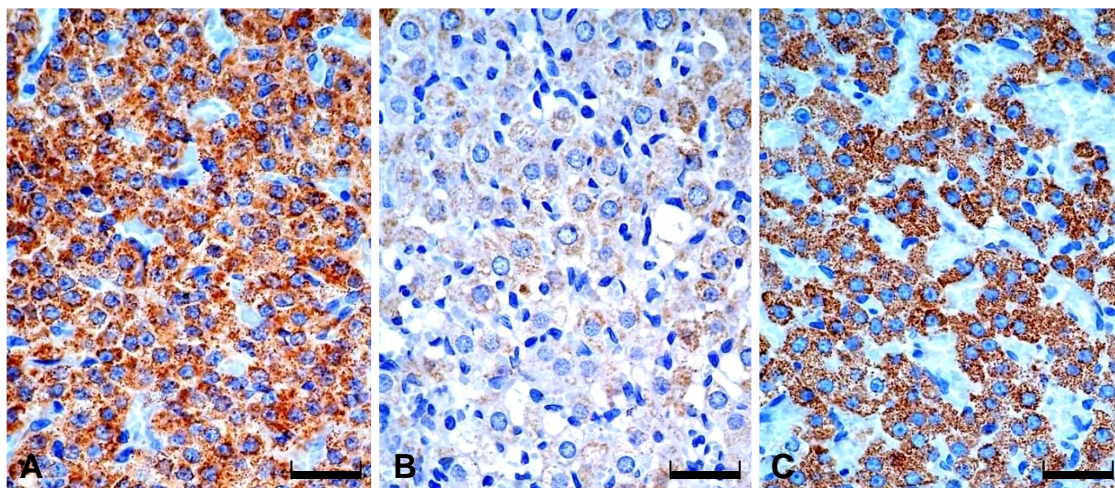


Figura 10. Ovário, rata, fase metaestro-diestro. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Grupos controle, hipotireóide e hipertireóide, respectivamente. Redução intensa da intensidade e da área de expressão de COX-2 no corpo lúteo jovem do grupo hipotireóide em relação ao controle. Grupo hipertireóide com redução da área de expressão de COX-2 em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom, Barra= 5,5 μ m.

DISCUSSÃO

De acordo com as concentrações plasmáticas de T4 livre e com os sinais clínicos, o tratamento dos animais com propiltiouracil e tiroxina foi suficiente para induzi-los e mantê-los nos estados hipo e hipertireóideo, respectivamente, o que corrobora com os resultados de Serakides *et al.* (2001b) e Silva *et al.* (2004) que utilizaram o mesmo esquema posológico adotado neste estudo para induzir disfunções tireoidianas.

Durante o desenvolvimento folicular, o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular é importante para direcionar os folículos à atresia ou ovulação (Quirk *et al.*, 2004). No entanto, não foram encontradas diferenças quanto à taxa proliferativa dos folículos entre os grupos experimentais, o que está de acordo com Dijkstra *et al.* (1996) que também não observaram diferenças quanto à proliferação das células da granulosa em folículos antrais de animais hipotireóideos. No entanto, Silva *et al.* (2004) demonstraram redução da proliferação das células da granulosa em folículos não antrais de ratas hipotireóideas. Mas Silva *et al.*, (2004), apesar de terem usado a mesma dose de propiltiouracil utilizada neste estudo, induziu o hipotireoidismo por tempo mais longo. Além disso, no estudo de Silva *et al.* (2004) foi utilizada a técnica de quantificação das regiões organizadoras de nucléolo argentafins (Agnor) para estudar a proliferação celular nos diferentes estágios do desenvolvimento folicular, diferente da técnica utilizada neste estudo.

Embora alguns trabalhos usem a quantificação de Agnors para dar um valor preditivo da atividade proliferativa da célula, eles fazem também o uso de outros marcadores para proliferação como Ki57, PCNA e CDC47 uma vez que as Agnors podem dar informações sobre o grau de diferenciação ou atividade celular ao invés do estado proliferativo da célula (Gos *et al.*,

2009; Avdalian *et al.*, 2010; Gillespie *et al.*, 2010). Além disso, as Agnors sofrem influência do perfil hormonal do animal, particularmente do estrógeno (Avdalian *et al.*, 2009), e talvez por isso Silva *et al.* (2004) tenha encontrado diferenças quanto ao número de Agnors nas células da granulosa de folículos secundários de ratas hipotireóideas, uma vez que ratas com hipotireoidismo apresentam alteração dos níveis plasmáticos dos hormônios sexuais (Hatsuta *et al.*, 2004).

Já foi comprovado que o hipotireoidismo reduz o número de folículos secundários e terciários e a taxa de ovulação (Silva *et al.*, 2004), enquanto o hipertireoidismo aumenta a ovulação e reduz a atresia folicular (Serakides *et al.*, 2001). Talvez essas alterações na taxa ovulatória dos animais estejam mais relacionadas com alterações na diferenciação celular, apoptose e na reorganização da matriz extracelular do ovário do que com a proliferação das células foliculares. Sabe-se que o remodelamento adequado da matriz extracelular do ovário é fundamental para a dinâmica folicular normal e ovulação, sendo que as metaloproteinases e seus inibidores estão envolvidos nesses processos e que a síntese de colágeno ovariano está diminuída em ratas com hipotireoidismo (Saha *et al.*, 2005).

Além disso, interesse considerável tem sido focado nos fatores intracelulares que controlam o processo de atresia folicular, particularmente das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), dos componentes da família do Bcl-2, que são fatores antiapoptóticos, e o sistema Fas, que também está envolvido na apoptose das células foliculares (Li *et al.*, 1998; Hussein, 2005; Slot *et al.*, 2006; Salvetti *et al.*, 2009). Muito desse interesse advém de estudos que têm observado alterações na dinâmica folicular resultantes do desequilíbrio desses fatores, como foi visto por Salvetti *et al.* (2009) em ovários policísticos de ratas. Por

isso, é importante mais pesquisas sobre o efeito das disfunções tireoidianas na expressão das metaloproteinasas e seus inibidores no ovário de ratas, bem como dos fatores intracelulares que controlam o processo apoptótico do folículo, no intuito de melhor esclarecer o porquê das alterações resultantes do hipo e hipertireoidismo.

Nos três grupos experimentais, os folículos antrais foram os principais folículos a sofrer atresia, corroborando com os resultados de dinâmica folicular (Markström *et al.*, 2002; Quirk *et al.*, 2004). O estágio de folículo antral inicial é o estágio mais crítico do desenvolvimento folicular durante o ciclo morfofuncional do ovário em humanos e roedores. Esses folículos começam a expressar receptores para o FSH que resulta em aumento da sua atividade proliferativa, mas se tornam dependentes dele para a sua sobrevivência, tornando-os mais susceptíveis ao processo de atresia (Markström *et al.*, 2002), o que justifica o grande número de folículos terciários apresentando corpos apoptóticos em relação aos folículos não antrais nos três grupos experimentais.

Também, tanto o grupo hipotireóideo como o hipertireóideo não apresentaram diferenças em relação ao controle quanto à expressão de VEGF, Flk-1 e COX-2 nos folículos ovarianos.

Em relação à expressão de VEGF e Flk-1 nos folículos ovarianos, mesmo não apresentando diferença entre os grupos, o padrão de expressão está de acordo com o descrito na literatura. A produção de VEGF é controlada de forma distinta em cada folículo ovariano de acordo com o tamanho folicular. A expressão de RNAm de VEGF no ovário de primatas ocorre em células da teca de folículos antrais e nas células da granulosa mais próximas do ovócito no folículo pré-ovulatório, mas não ocorre nas células da granulosa de folículos primordiais e pré-antrais (Kaczmarek *et al.*, 2005). A

ação permeabilizante do VEGF parece ser essencial na formação do antro durante o desenvolvimento folicular (Zimmermann *et al.*, 2003). Já em folículos de bovinos e suínos, a expressão de VEGF é fraca durante o desenvolvimento folicular ovariano inicial e torna-se mais pronunciada nas células da teca e da granulosa durante o desenvolvimento do folículo dominante (Kaczmarek *et al.*, 2005; Hunigen *et al.*, 2008). Os ovários de ratas apresentam semelhança ao de bovinos e suínos quanto à expressão de VEGF, mas alguns folículos secundários da rata também expressam VEGF na zona pelúcida, sugerindo que esse fator seja importante para a seleção dos folículos dominantes (Celik-Ozenci *et al.*, 2003).

Já em relação ao Flk-1, Celik-Ozenci *et al.* (2003) também verificaram em ratas que as células da granulosa de folículos primários e secundários e da teca interna de folículos secundários e terciários apresentam forte expressão de Flk-1, que vai mediar a migração e a proliferação das células endoteliais determinados pelo VEGF (Kaczmarek *et al.*, 2005). Postula-se que essa maior expressão de Flk-1 em folículos primários e secundários ocorra para que o VEGF efetue seu papel citoprotetor, ou seja, proteja as células da granulosa da apoptose celular e da atresia folicular, uma vez que folículos saudáveis exibem baixa incidência de apoptose e alta expressão de Flk-1 nas células da granulosa, enquanto folículos em atresia, por outro lado, têm um significativo número de células da granulosa em apoptose e reduzida expressão de Flk-1 (Greenaway *et al.*, 2004; Kaczmarek *et al.*, 2005).

No entanto, um achado comum aos três grupos experimentais foi a expressão de COX-2 na teca de folículos terciários e pré-ovulatórios, contrário a outros trabalhos que relatam ausência de expressão da COX-2 na teca de animais domésticos (Liu *et al.*, 1997; Sirois e Dore, 1997). Mas, Duffy e Stouffer (2001) também demonstraram expressão de

COX-2 na camada da teca de folículos pré-ovulatórios de primatas. O papel da COX-2 na camada da teca ainda é incerto, mas acredita-se que seja para a manutenção de um nível basal de prostaglandinas no tecido ovariano (Duffy e Stouffer, 2001).

Ao contrário do efeito observado no desenvolvimento folicular, as disfunções tireoidianas apresentaram efeito marcante e significativo sobre a expressão dos fatores estudados nos corpos lúteos.

O hipotireoidismo reduziu significativamente a taxa proliferativa nos corpos lúteos jovens, particularmente das células do pericito e endoteliais, o que demonstra que a hipofunção tireoidiana pode afetar o desenvolvimento vascular do corpo lúteo jovem na fase de metaestro-diestro. Essa redução da taxa proliferativa das células endoteliais e do pericito talvez seja resultado da redução da expressão de COX-2 encontrada no corpo lúteo jovem desses animais, uma vez que a COX-2 está envolvida na síntese de PGE2 (Arosh *et al.*, 2004). Sakurai *et al.* (2005) verificaram que a PGE2 estimula a angiogênese e a permeabilidade vascular no corpo lúteo recém-formado. Por isso, alguns fármacos anti-inflamatórios seletivos de COX-2 tem resultado em distúrbios reprodutivos na fêmea, dentre eles o comprometimento da angiogênese luteal (Sakurai *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2004; El-Nefiawy *et al.*; 2005; Sakurai *et al.*, 2005). Por isso, os efeitos autócrinos e/ou parácrinos das prostaglandinas luteais podem estar envolvidos no controle das funções e do tempo de vida do corpo lúteo (Arosh *et al.*, 2004).

No entanto, como é possível a redução da angiogênese no corpo lúteo jovem dos animais hipotireóides ocorrer concomitante ao aumento dos níveis de progesterona (Hatsuta *et al.*, 2004), uma vez que a vascularização no corpo lúteo é indispensável para a síntese de

progesterona? Hapon *et al.* (2007) observaram que o aumento dos níveis circulantes de progesterona em animais com hipotireoidismo é resultado do atraso no declínio circulante dela e não do aumento da sua síntese luteal.

Vale lembrar que as concentrações de PGE2 variam de acordo com o estágio do desenvolvimento luteal, de modo que a expressão de COX-2, PGE2 e PGF2 α é altamente modulada. Como observado neste estudo com relação à expressão de COX-2, a expressão de PGF2 α e a biossíntese de PGE2 é maior no corpo lúteo jovem e inferior no corpo lúteo em regressão (Arosh *et al.*, 2004).

Surpreendentemente, o hipotireoidismo aumentou a expressão de VEGF e reduziu o número de corpos apoptóticos no corpo lúteo jovem. Já os animais hipertireóides, embora não tenham apresentando diferença visível quanto à expressão de VEGF em relação ao controle, apresentaram aumento significativo do número de corpos apoptóticos nos corpos lúteos. Sabe-se que o VEGF apresenta ação anti-apoptótica, uma vez que suprime a apoptose das células endoteliais vasculares por controlar as proteínas da família Bcl-2 (Kaczmarek *et al.*, 2005) e que sua inibição resulta em apoptose das células foliculares (Abramovich *et al.*, 2006; Kosaka *et al.*, 2007). Assim, possivelmente, o aumento da expressão de VEGF nas células luteínicas dos animais hipotireóides está mais associado ao seu efeito anti-apoptótico do que como mitógeno de células endoteliais, uma vez que, como descrito anteriormente, houve redução da atividade proliferativa das células endoteliais e do pericito no corpo lúteo jovem dos animais hipotireóides. Estudos de RT-PCR tempo real poderiam fornecer informações adicionais sobre a síntese de VEGF no corpo lúteo de ratas com hipotireoidismo.

Também, é interessante ressaltar que o VEGF estimula a expressão de RNAs de COX-2 e de PGE sintase em células luteínicas *in vitro* (Sakurai *et al.*, 2004), de modo que esse aumento de VEGF no hipotireoidismo pode explicar porque Hapon *et al.* (2007) encontrou maiores níveis de PGE2 em ratas hipotireóideas.

Vale lembrar que níveis plasmáticos de prolactina e progesterona mais elevados em ratas com hipotireoidismo (Hatsuta *et al.*, 2004), associado a maior expressão de VEGF no corpo lúteo, pode favorecer a redução do número de corpos apoptóticos observado neste estudo. Alguns trabalhos sugerem que a progesterona suprime a atividade da caspase-3 (Svensson *et al.*, 2001; Okuda *et al.*, 2004), a apoptose celular (Robker *et al.*, 2000) e a degeneração (Young e Stouffer, 2004) no corpo lúteo de espécies animais com fase luteínica longa. Já Takiguchi *et al.* (2004) também observaram que o aleitamento em ratas inibe a apoptose luteal pós-parto, sugerindo efeito anti-apoptótico da prolactina.

A menor expressão de COX-2 encontrada no corpo lúteo jovem da fase de metaestro-diestro dos animais hipotireóideos também pode causar redução da formação de PGF2 α , que é considerado o principal fator luteolítico na maioria dos mamíferos (Arosh *et al.*, 2004). Isso também pode explicar o porquê do prolongamento da fase de metaestro-diestro e o atraso do parto nesses animais (Rosato *et al.*, 1992). A PGF2 α tem o principal papel de induzir a expressão da 20 α -hidroxiesteroide desidrogenase (20 α HSD), uma enzima que converte a progesterona luteal na sua forma inativa (20 α -dihidroprogesterona) (Arosh *et al.*, 2004). Esses resultados estão de acordo com Hapon *et al.* (2007) que viram que o atraso na regressão luteal e do parto em animais hipotireóideos é causado pela diminuição de fatores luteolíticos, principalmente PGF2 α , além da redução da expressão de RNAm de iNOS e LH circulante, sendo que todos eles

são causas direta da redução da proteína e RNAm da 20 α HSD (Mattheij *et al.*, 1995; Hapon *et al.*, 2007).

Já em relação aos animais hipertireóideos, houve aumento da apoptose e redução da expressão de COX-2 no corpo lúteo jovem. Portanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar o mecanismo pelo qual os animais com hipertireoidismo demonstraram aumento do número de corpos apoptóticos no corpo lúteo, independentemente da fase do ciclo estral. Contudo, esses dados já explicam, pelo menos em parte, o porquê do encurtamento da fase de metaestro-diestro e o parto precoce encontrado em ratas com hipertireoidismo (Choksi *et al.*, 2003).

Apesar de não terem sido encontradas diferenças na expressão de Flk1, receptor do VEGF, entre os corpos lúteos dos três grupos experimentais, foi observada grande expressão dele em células luteínicas que se encontravam em processo degenerativo, como também nos corpos lúteos maduros e em regressão quando comparado aos corpos lúteos jovens. Essa informação ainda não havia sido descrita e não se sabe o porquê desse aumento do Flk-1 em células que começam a entrar em processo degenerativo. O que se sabe é que a expressão de Flk-1 aumenta em condições de hipóxia (Waltenberger *et al.*, 1996) e no tratamento com gonadotropinas (Gomez *et al.*, 2003). Assim, seria a hipóxia a causa da maior expressão de Flk-1 em corpos lúteos maduros e em regressão, uma vez que durante essa fase do desenvolvimento luteal ocorre redução intensa do número de vasos sanguíneos (Stouffer *et al.*, 2001)? Seria o aumento da expressão do Flk-1 um meio pelo qual as células luteínicas teriam para manter sua viabilidade e atividade por mais tempo? Mais pesquisas são necessárias para tentar esclarecer a relação da expressão de Flk-1 com o processo apoptótico ou degenerativo das células luteínicas.

CONCLUSÕES

O hipo e o hipertireoidismo não afetam a atividade proliferativa e a expressão de VEGF, Flk-1 e de COX-2 nos folículos ovarianos de ratas.

O hipotireoidismo experimental reduz a atividade proliferativa, a vascularização e a apoptose, bem como aumenta a expressão de VEGF e reduz a expressão de COX-2 no corpo lúteo de ratas.

O hipertireoidismo experimental aumenta a atividade apoptótica e reduz a expressão da COX-2 no corpo lúteo de ratas.

O efeito das disfunções tireoidianas na atividade proliferativa, angiogênica, apoptótica e na expressão da COX-2 são dependentes do estágio de desenvolvimento do corpo lúteo e da fase do ciclo estral.

CAPITULO 3

Desenvolvimento placentário e fetal e atividade luteal de ratas com hipotireoidismo

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento fetal por agirem diretamente no tecido placentário, uterino e ovariano, via receptores específicos, modulando o metabolismo e o desenvolvimento desses órgãos (Mauro *et al.*, 1992; Galton *et al.*, 2001; James *et al.*, 2007).

Em uma seqüência de estudos, têm-se demonstrado que o hipertireoidismo induzido em modelos animais aumenta a taxa de ovulação e de concepção e causa alterações placentárias importantes no que concerne à proliferação e apoptose celular sem alterar a viabilidade embrionária e fetal (Serakides *et al.*, 2001ab; Oliveira *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007). Em marrãs, o hipertireoidismo aumenta a expressão do VEGF placentário e a vascularização uterina (Souza *et al.*, 2010). No entanto, até o presente momento, são poucos os estudos que tenham avaliado o papel da placenta na dificuldade de manutenção da gestação e no comprometimento do desenvolvimento fetal advindos do hipotireoidismo (Shafrir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 1999).

Acredita-se que a infertilidade decorrente do hipotireoidismo seja resultado da hipofunção ovariana (Wakim *et al.*, 1993). No entanto, o hipotireoidismo pode afetar a taxa de concepção não somente por reduzir a taxa de ovulação, mas também por prejudicar a decidualização durante a implantação embrionária (Galton *et al.*, 2001), por alterar

os estoques de glicogênio placentário (Shafrir *et al.*, 1994) e por afetar a expressão de c-fos e c-jun em ratas gestantes (Morrish *et al.*, 1997). Contudo, ainda não se conhece o efeito do hipotireoidismo na atividade proliferativa, angiogênica e apoptótica da placenta.

Durante a gestação, o útero sofre uma série de modificações que resulta em extensa reorganização tecidual cuja principal finalidade é acomodar o concepto (Correia-da-Silva *et al.*, 2004). Toda essa reorganização tecidual que envolve a implantação, decidualização e placentação, depende da interação e do equilíbrio entre proliferação, morte celular e angiogênese (Joswig *et al.*, 2003).

O equilíbrio entre as taxas de proliferação e morte celular é essencial para o sucesso da implantação e manutenção do embrião durante todo o período gestacional (Kokawa *et al.*, 1998; Savion *et al.*, 2002). E, alterações no processo apoptótico da unidade uteroplacentária e/ou do sistema genital tem sido associadas a diferentes processos patológicos durante a gestação, como por exemplo, a ocorrência de aborto espontâneo em humanos no primeiro trimestre de gestação (Kokawa *et al.*, 1998; Heazell e Crocker, 2008). Uma das hipóteses deste estudo é a de que o hipotireoidismo causa disfunção placentária por afetar o equilíbrio entre proliferação celular e apoptose.

No entanto, a angiogênese placentária também é de fundamental importância para manutenção da gestação uma vez que está envolvida desde a implantação embrionária e decidualização até a formação definitiva da placenta (Reynolds *et al.*, 2010). Em mulheres, o aborto espontâneo e a pré-eclâmpsia podem estar associados com alterações no desenvolvimento vascular da placenta e, particularmente, com a expressão do VEGF (Redmer *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Luther *et al.*

al., 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008). Em relação ao hipotireoidismo, também não se conhece seu efeito sobre o desenvolvimento vascular da placenta. Por isso, outra hipótese deste estudo é a de que a hipofunção tireoidiana afeta a gestação por alterar a expressão placentária de VEGF.

Outro efeito do hipotireoidismo em ratas e ovelhas gestantes é o aumento do período gestacional. Pelo fato do experimento anterior ter demonstrado redução da expressão de COX-2 no corpo lúteo de ratas não gestantes, postulou-se que o prolongamento do período gestacional possa estar associado à redução da expressão de COX-2 e a alterações da taxa proliferativa e apoptótica também no corpo lúteo de ratas ao final da gestação.

Assim, avaliar a histomorfometria placentária como também a atividade proliferativa, angiogênica e apoptótica na placenta e no corpo lúteo de ratas gestantes hipotireóideas é pertinente e se constitui no objetivo deste estudo. Esclarecer o porquê dos distúrbios gestacionais e da baixa taxa de concepção decorrentes do hipotireoidismo pode ajudar a estabelecer estratégias de tratamento das infertilidades geradas por desequilíbrios na proliferação, apoptose e na angiogênese placentária.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura do Laboratório de Experimentação Animal e do Laboratório de Histopatologia e Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG

(protocolo nº 239/2009) (Anexo 4). O projeto contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 470676/2009-4).

Indução do hipotireoidismo e acasalamento

Foram utilizadas 36 ratas Wistar com dois meses de idade alojadas em caixas plásticas (6 animais/caixa) onde receberam a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em dois grupos, tratado e controle, com 18 animais em cada. O grupo tratado recebeu diariamente, por sonda orogátrica, 1mg/animal de 6-propyl-2-thiouracil¹ diluído em 5 mL de água destilada. Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada como placebo.

Após cinco dias do início do tratamento, ou seja, da indução do hipotireoidismo, as fêmeas, de ambos os grupos, foram submetidas à citologia vaginal (Marcondes *et al.*, 2002) corado por hematoxilina-eosina para acompanhamento do ciclo estral. As ratas em estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de três fêmeas para cada macho. Após esse período, esfregaços vaginais foram realizados diariamente, a fim de detectar a presença de espermatozóides. A cópula foi confirmada pela presença destes no esfregaço e esse dia foi designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais do grupo tratado e controle continuaram recebendo 6-propyl-2-thiouracil e água destilada, respectivamente, por sonda orogátrica, durante todo o período experimental.

¹ P3755;Sigma, St Louis, MO, USA.

Dosagem plasmática de T4 livre

Nos dias 0, 14 e 19 dias de gestação, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com sobredose de anestésico. Após serem anestesiados com xilazina e quetamina, os animais foram submetidos à colheita de sangue por punção intracardíaca. O sangue foi colhido em tubos com heparina para obtenção do plasma e armazenado a -200C para dosagem de tiroxina (T4) livre ao 0 e 19 dias de gestação. A dosagem de T4 livre foi realizada pela técnica de quimioluminescência (Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA) em sistema totalmente automático e de acordo com as recomendações do fabricante dos kits. Os

coeficientes de variação intra e interensaio foram de 4% e 7%, respectivamente.

Necropsia e processamento histológico

Na necropsia foram colhidos os ovários e o útero contendo a placenta e os fetos (Fig.1). Os ovários foram dissecados e o peso médio foi obtido. O útero contendo a placenta e os fetos foi separado da tuba e dos ovários e posteriormente pesado. Os fetos foram quantificados, pesados e avaliados quanto à sua viabilidade. Foi obtido o peso médio dos fetos de cada rata. O número de sítios de inserção placentária também foi quantificado e subtraído do número de fetos viáveis, multiplicado por 100 e dividido pelo número total de sítios para obtenção da porcentagem de morte fetal.

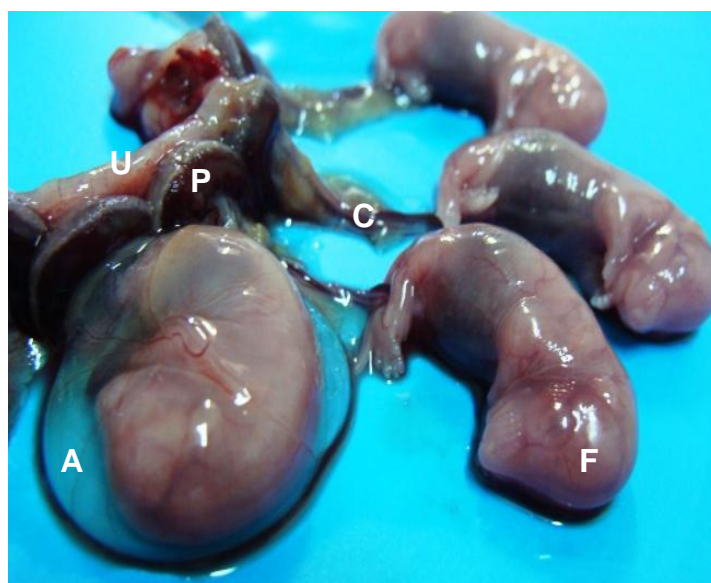


Figura 1: Útero (U) aberto de rata gestante (grupo controle) evidenciando-se discos placentários (P) ligados pelos cordões umbilicais (C) aos respectivos fetos (F) *in situ*. A - Âmnio.

As tireóides dos animais com 19 dias de gestação foram pesadas, fixadas em formalina a 10% e incluídas em parafina. Secções histológicas de 4 μ m coradas pela hematoxilina-eosina foram submetidas à análise histomorfométrica. Com auxílio de

uma gráticula de 121 pontos, acoplada ao microscópio óptico e em objetiva de 40 \times , foi determinada a porcentagem média de área ocupada por epitélio folicular, lúmen e estroma, em 10 campos aleatórios.

Cinco discos placentários/rata e os ovários foram respectivamente fixados em paraformaldeído 4% e em formalina a 10% por 20 horas e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 µm dos discos placentários e dos ovários foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica. Algumas secções histológicas de disco placentário foram coradas pela técnica do ácido periódico-Schiff (PAS) para detecção das células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto. Secções histológicas dos discos placentários e dos ovários em lâminas silanizadas também foram submetidas à imunistoquímica e à técnica de túnel.

Análise histomorfométrica

No disco placentário, foi obtida a média da espessura do sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário tomada em 10 regiões aleatórias com o auxílio de uma ocular micrométrica e em objetiva de 20×, 10× e 4×, respectivamente. Os valores foram transformados para milímetros com auxílio de uma lâmina micrométrica.

Na camada do espongiotrofoblasto foi avaliada a porcentagem da área ocupada pelas células de glicogênio em relação às citotrofoblásticas. Foi obtida a média da porcentagem dessas células em 10 campos aleatórios, com auxílio de uma gráticula de 121 pontos acoplada a um microscópio óptico e em objetiva de 40×. Nessa camada também foi quantificado o número total de células/campo em oito campos aleatórios em objetiva de 40×. Para a quantificação foi realizada a captura de imagens em câmera digital *Spot Insign Color* adaptado a um microscópio *Olympus BX-40* e utilizado o software de captura *SPOT*[®] versão 3.4.5. Para a análise das imagens foi utilizado o software *Image Pro Plus*[®] versão 4.5.

No labirinto placentário, foi determinada a porcentagem da área ocupada por sangue materno, pelas células trofoblásticas/endoteliais, e pelos capilares fetais, em 10 e 15 campos aleatórios aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente. Essa porcentagem foi obtida com o auxílio de uma gráticula de 121 pontos acoplada a um microscópio óptico e objetiva de 40×. Nessa camada também foi obtido o número total de células/campo, com objetiva de 40×, em 6 e 10 campos aleatórios aos 14 e 19 dias de gestação, respectivamente. A análise foi realizada pela captura de imagens em câmera digital *Spot Insign Color* adaptada a um microscópio *Olympus BX-40* e utilizado o software de captura *SPOT*[®] versão 3.4.5. Para a análise das imagens foi utilizado o software *Image Pro Plus*[®] versão 4.5.

Para todas as variáveis descritas anteriormente, a média foi obtida da avaliação de cinco discos placentários por animal.

Nos ovários foi quantificado o número médio de corpos lúteos total em toda a área abrangida pela secção histológica, em cinco secções seriadas por ovário obtidas com intervalos de 160 µm.

Imunistoquímica

Para imunistoquímica dos discos placentários foram utilizados os anticorpos anti-VEGF¹ e anti-CDC47². Já nos ovários foram utilizados os anticorpos anti-VEGF, anti-Flk-1 (receptor do VEGF)³, anti-COX-2⁴ e anti-CDC47.

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase⁵ e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em

¹ sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

² clone 47DC141, NeoMarkers, Fremont, CA, USA

³ sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

⁴ M3617, Dako, St Louis, MO, USA

⁵ Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, (ready to use). Lab Vision Corp., Fremont, CA, Usa

banho-maria a 98°C, utilizando solução Retrieval (Anexo 2). As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário (Tab. 1) e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio⁶ e estreptavidina peroxidase⁷. A incubação com anticorpo secundário⁸ foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB)⁹ e o tempo de incubação variou de acordo com o anticorpo primário (Tab. 1). As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

A porcentagem de células do sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e do labirinto placentário com expressão de CDC-47 foi determinada em 10, 10 e 15 campos aleatórios, respectivamente, em objetiva de 40×, considerando o total de células/campo. Para essa determinação foi realizada a captura de imagens em câmara digital *Spot Insign Color* adaptada a um microscópio *Olympus BX-40* e utilizado o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. Para a análise das imagens foi utilizado o software *Image Pro Plus*[®] versão 4.5.

A porcentagem média de áreas com expressão de VEGF na camada do espongiotrofoblasto e do labirinto placentário foi determinada com o auxílio de uma grátula de 121 pontos acoplada ao microscópio óptico, em objetiva de 40×, em 10 e 15 campos aleatórios, respectivamente.

No corpo lúteo, foi determinada a porcentagem de células com expressão de CDC-47 em um total de 500 células, diferenciando células luteínicas, endoteliais ou do pericito. A contagem foi realizada

com objetiva de 40× em três corpos lúteos jovens por animal. Para a quantificação foi realizada a captura de imagens em câmara digital *Spot Insign Color* adaptado a um microscópio *Olympus BX-40* e utilizado o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. Para a análise das imagens foi utilizado o software *Image Pro Plus*[®] versão 4.5. A avaliação da expressão de VEGF, Flk-1 e COX-2 no corpo lúteo foi descritiva.

Avaliação da técnica de túnel

Células apoptóticas da placenta e dos corpos lúteos foram marcadas pela técnica de túnel utilizando o *TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit*¹⁰ (Anexo 3). A recuperação antigênica foi feita com proteinase K por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C com o *TdT* por 1 hora e 30 minutos e por 30 minutos à temperatura ambiente nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e estreptavidina. O cromógeno utilizado foi o DAB e o tempo de incubação foi de 15 minutos. As secções foram contra-coradas com *methyl green*. O controle negativo foi obtido pela substituição do TdT por TBS. Para o controle positivo foram utilizadas secções histológicas de ovário com folículos atresícos.

Nas camadas do espongiotrofoblasto e do labirinto placentário foi realizada a contagem de células apoptóticas em objetiva de 40×. Foram escolhidos aleatoriamente seis campos na camada do espongiotrofoblasto e 10 campos no labirinto placentário para os discos com 14 dias de gestação. Nos discos com 19 dias de gestação foram escolhidos 8 e 15 campos aleatórios para o espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente.

⁶ Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA, Usa

⁷ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, Usa

⁸ Biotin Goat, Lab Vision Corp., Fremont, CA, Usa

⁹ DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA, Usa

¹⁰ TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Calbiochem.

No corpo lúteo, o número de células apoptóticas foi quantificado em objetiva de 40× em quatro campos/corpo lúteo, obtendo-

se o valor médio de todos os corpos lúteos da secção histológica.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na placenta e ovário com suas respectivas diluições e tempos de incubação com diaminobenzidina (DAB)

Tecido	Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	DAB
Placenta	Anti-VEGF	Coelho/ policlonal	1:100	15 minutos
	Anti-CDC47	Camundongo/ monoclonal	1:100	8 minutos
Ovário	Anti-VEGF	Coelho/ policlonal	1:100	45 segundos
	Anti-Flk1	Camundongo/ monoclonal	1:600	6 minutos
	Anti-COX2	Camundongo/ monoclonal	1:50	30 minutos
	Anti-CDC47	Camundongo/ monoclonal	1:200	10 minutos

Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2 x 2 (dois grupos x dois períodos). Para cada variável estudada foi determinada a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste *T de Student*. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Indução do hipotireoidismo

As concentrações plasmáticas de T4 livre no grupo tratado com 6-propyl-2-thiouracil foram significativamente menores do que as do grupo controle aos 0 e 19 dias de gestação, o que confirma a indução do estado hipotireóideo durante todo o período gestacional (Tab. 2).

As tireóides das ratas hipotireóideas eram maiores e significativamente mais pesadas em comparação a das ratas controle (Tab. 3). Histologicamente, essas tireóides apresentavam adenomatose intra e interfolicular caracterizada pela presença de folículos revestidos por células cuboidais altas e com projeção papiliforme de células para o lúmen que apresentava pouco colóide. Por entre esses folículos, havia também aglomerados de células foliculares desprovidos de lúmen e um estroma conjuntivo bastante proeminente. A porcentagem de células foliculares e de estroma era significativamente maior no grupo tratado com 6-propyl-2-thiouracil, ao contrário da porcentagem de lúmen folicular, que foi maior no grupo controle (Tab. 3). Em contrapartida, as ratas controle apresentavam tireóides contendo folículos redondos ou ovais, de tamanhos variados, com grande quantidade de colóide e que era revestido, por uma única camada de células cuboidais achatadas ou cubóides.

Tabela 2. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da dosagem plasmática de T4 livre dos grupos controle e hipotireóideo aos 0 e 19 dias de gestação

T4 livre (ng/dL)	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
0 dias de gestação	1,196 ± 0,12 A	0,56 ± 0,28 B
19 dias de gestação	0,80 ± 0,17 A	0,10 ± 0,08 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 3. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso e da porcentagem de epitélio folicular, lúmen e estroma da tireóide dos grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
Peso da tireóide (g)	0,01 ± 0,001 B	0,03 ± 0,004 A
Epitélio folicular	44,90 ± 5,53 B	53,63 ± 2,76 A
Lúmen folicular	50,38 ± 5,59 A	38,03 ± 3,13 B
Estroma	4,72 ± 1,09 B	8,34 ± 0,81 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Número e características dos fetos

Os animais hipotireóideos não apresentaram alteração significativa do número total de fetos e nem na taxa de mortalidade fetal (Tab. 4). No entanto, o peso dos fetos das ratas com hipotireoidismo foi significativamente menor aos 14 e 19 dias de

gestação em comparação ao grupo controle (Tab. 4 e Fig. 2). Além disso, foi verificado que o peso do útero com a placenta sofreu redução significativa nos animais hipotireóideos aos 19 dias de gestação, efeito não encontrado aos 14 dias de gestação (Tab. 5).

Tabela 4. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de fetos/fêmea, da taxa de mortalidade fetal e do peso dos fetos dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
Nº total de fetos	12,00 ± 1,58 A	13,20 ± 1,1 A
% morte fetal	4,57 ± 5,33 A	8,80 ± 11,71 A
Peso dos fetos (g)	0,17 ± 0,006 A	0,15 ± 0,01 B
19 dias		
Nº total de fetos	12,08 ± 1,38 A	11,77 ± 1,79 A
% morte fetal	3,04 ± 4,51 A	3,06 ± 4,98 A
Peso dos fetos (g)	2,51 ± 0,11 A	2,22 ± 0,10 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).



Figura 2. Fetos de ratas com 19 dias de gestação. Fetos do grupo hipotireóideo com o tamanho inferior ao do grupo controle.

Tabela 5. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso do útero mais placenta aos 14 e 19 dias de gestação dos grupos controle e hipotireóideo

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
Peso útero e placenta aos 14 dias (g)	7,968 ± 0,61 A	7,74 ± 0,75 A
Peso útero e placenta aos 19 dias (g)	25,78 ± 2,61 A	21,94 ± 3,00 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Histomorfometria placentária

Independentemente do grupo, o sinciotrofoblasto era composto por células binucleadas ou com um único núcleo gigante e com citoplasma, ora eosinofílico ora basofílico, que freqüentemente continha múltiplos vacúolos. Em algumas regiões, essas células formavam uma massa plasmodial semeada de núcleos pequenos com cromatina densa (sincício) (Fig.3). Embora, a espessura dessa camada não tenha diferido entre grupos aos 14 e 19 dias de gestação (Tab. 6), seu número de células/campo foi significativamente menor nas ratas hipotireóideas aos 14 dias, ao contrário dos 19 dias de gestação, no qual o

grupo hipotireóideo apresentou aumento da celularidade do sinciotrofoblasto em comparação ao controle (Tab. 7).

Em ambos os grupos o espongiotrofoblasto era formado por duas distintas populações celulares. As células citotrofoblásticas apresentavam-se bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com nucléolo único vesicular e citoplasma escasso, claro ou eosinofílico e com borda distinta. Já as células de glicogênio possuíam um núcleo mais condensado e com citoplasma com vacúolos PAS positivos (grânulos de glicogênio) (Fig.3). Aos 14 e 19 dias de gestação, o hipotireoidismo reduz significativamente a espessura do

espongiotrofoblasto (Tab. 6 e Fig. 4) e seu número de células/campo aos 14 dias de gestação (Tab. 7). Além disso, aos 19 dias de gestação o espongiotrofoblasto das ratas

hipotireóideas apresentou porcentagem significativamente maior das células de glicogênio em relação às células citotrofoblásticas (Tab. 7 e Fig. 5).

Tabela 6. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura das camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
Espessura do sinciotrofoblasto (mm)	0,15 ± 0,04 A	0,15 ± 0,02 A
Espessura do espongiotrofoblasto (mm)	0,70 ± 0,13 A	0,58 ± 0,09 B
Espessura do labirinto placentário (mm)	1,12 ± 0,31 A	1,02 ± 0,24 A
19 dias		
Espessura do sinciotrofoblasto (mm)	0,05 ± 0,02 A	0,05 ± 0,01 A
Espessura do espongiotrofoblasto (mm)	0,49 ± 0,12 A	0,39 ± 0,11 B
Espessura do labirinto placentário (mm)	2,36 ± 0,23 B	2,61 ± 0,33 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 7. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de células trofoblásticas/campo nas camadas do disco placentário e da porcentagem de células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
Nº cels/campo do sinciotrofoblasto	12,1 ± 2,65 A	10,55 ± 1,31 B
Nº cels/campo do labirinto placentário	235,51 ± 41,28 A	196,19 ± 37,69 B
Nº cels/campo do espongiotrofoblasto	196,35 ± 37,99 A	174,43 ± 21,30 B
% de células de glicogênio	59,12 ± 6,52 A	55,63 ± 8,14 A
19 dias		
Nº cels/campo do sinciotrofoblasto	5,74 ± 0,78 B	8,48 ± 1,28 A
Nº cels/campo do labirinto placentário	126,8 ± 26,21 A	88,59 ± 15,12 B
Nº cels/campo do espongiotrofoblasto	90,29 ± 10,18 A	87,10 ± 12,52 A
% de células de glicogênio aos 19 dias	10,86 ± 3,03 B	27,799 ± 10,27 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

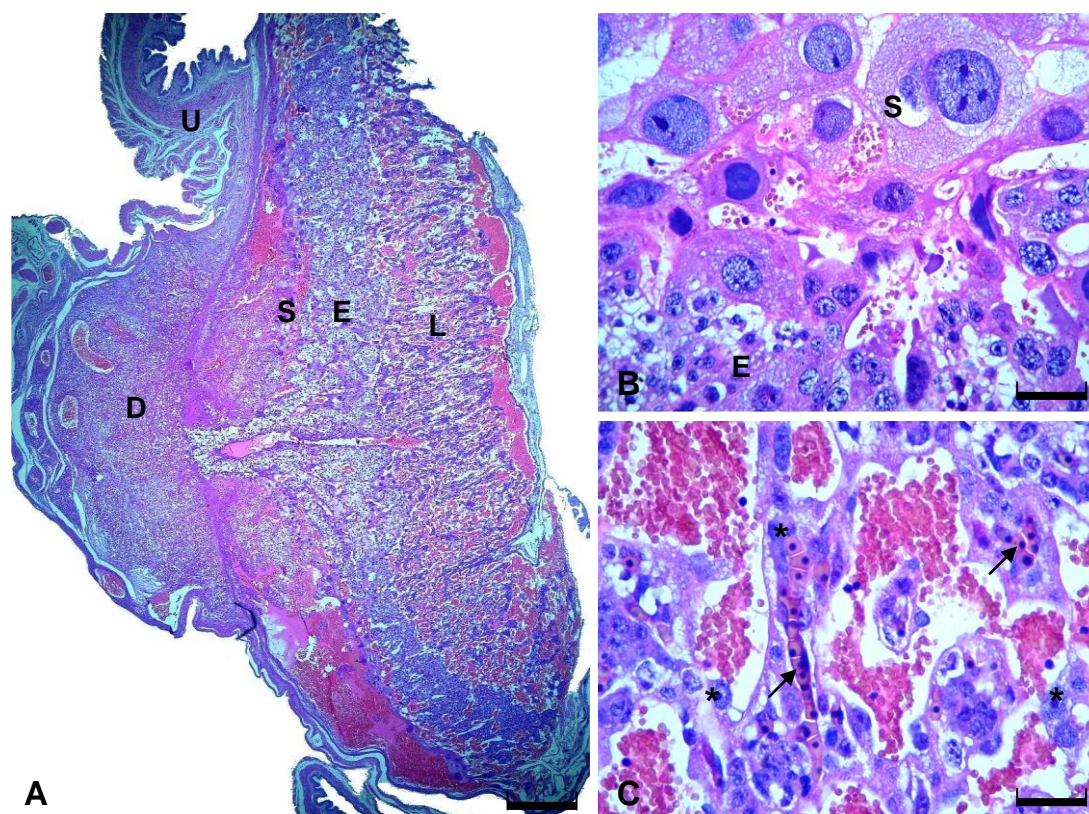


Figura 3. Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. HE. A) Visão panorâmica do disco placentário com sinciotrofoblasto (S), espongiotrofoblasto (E), labirinto placentário (L), decídua (D) e útero (U); Barra= 31,4µm. B) Detalhe das camadas do sinciciotrofoblasto (S) e espongiotrofoblasto (E). Sinciciotrofoblasto formado por células fundidas que compartilham o mesmo citoplasma, ora eosinofílico ora basofílico. Espongiotrofoblasto constituído por células bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com citoplasma escasso; Barra= 5 µm. C) Detalhe do labirinto placentário com finos capilares fetais (setas) sustentados por pequena quantidade de tecido conjuntivo e rodeados por células trofoblásticas alongadas ou ovóides (asterisco); Barra= 3,4 µm.

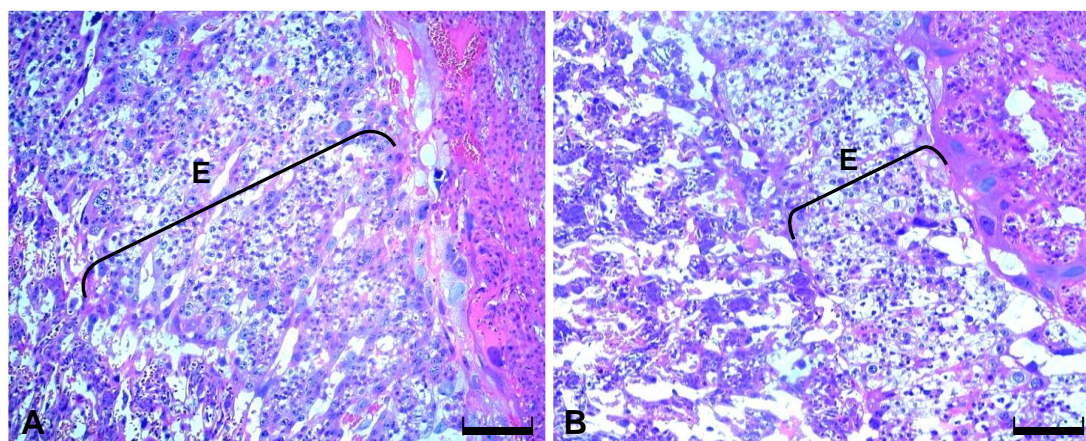


Figura 4. Disco placentário, rata, 14 dias de gestação. HE. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto (E) mais delgada no grupo hipotireóideo; Barra=16 µm.

Tanto no grupo controle quanto no hipotireóideo, o labirinto placentário aos 14 e 19 dias de gestação apresentava finos capilares fetais contendo hemácias nucleadas e que era sustentado por pequena quantidade de tecido conjuntivo, de permeio a células trofoblásticas alongadas ou ovóides. Essas células trofoblásticas delimitavam grandes seios vasculares que eram ocupados por sangue materno (Fig. 3). No entanto, aos 19 dias de gestação, os feixes de células trofoblásticas eram bem mais delgados e menos celularizados em relação aos 14 dias de gestação, com a malha vascular bem mais ramificada. O efeito do hipotireoidismo sobre o labirinto variou de acordo com o período gestacional. Aos 14 dias, o grupo hipotireóideo

apresentou redução significativa da porcentagem de área ocupada por capilar fetal, ao contrário do que foi observado aos 19 dias (Tab. 8). No terço final da gestação, o hipotireoidismo aumentou significativamente a espessura do labirinto placentário (Tab. 6) e as áreas ocupadas pelo seio vascular materno com redução significativa da porcentagem de área ocupada pelas células trofoblásticas/endoteliais em relação ao grupo controle (Tab. 8 e Fig. 6). Em resumo, o aumento na espessura do labirinto placentário foi decorrente da dilatação do seio vascular materno, já que o número de células/campo foi significativamente menor aos 14 e 19 dias de gestação (Tab. 7).

Tabela 8. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área ocupada por sangue materno, trofoblasto/endotélio e capilar fetal na camada do labirinto placentário nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias de gestação		
% seio materno	38,93 ± 7,54 A	39,98 ± 8,37 A
% célula trofoblástica/endotelial	55,73 ± 7,70 A	56,04 ± 8,75 A
% capilar fetal	5,13 ± 1,64 A	3,98 ± 1,29 B
19 dias de gestação		
% seio materno	47,12 ± 5,06 B	53,96 ± 4,84 A
% célula trofoblástica/endotelial	49,64 ± 5,43 A	41,03 ± 4,72 B
% capilar fetal	2,67 ± 1,79 B	5,28 ± 2,25 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

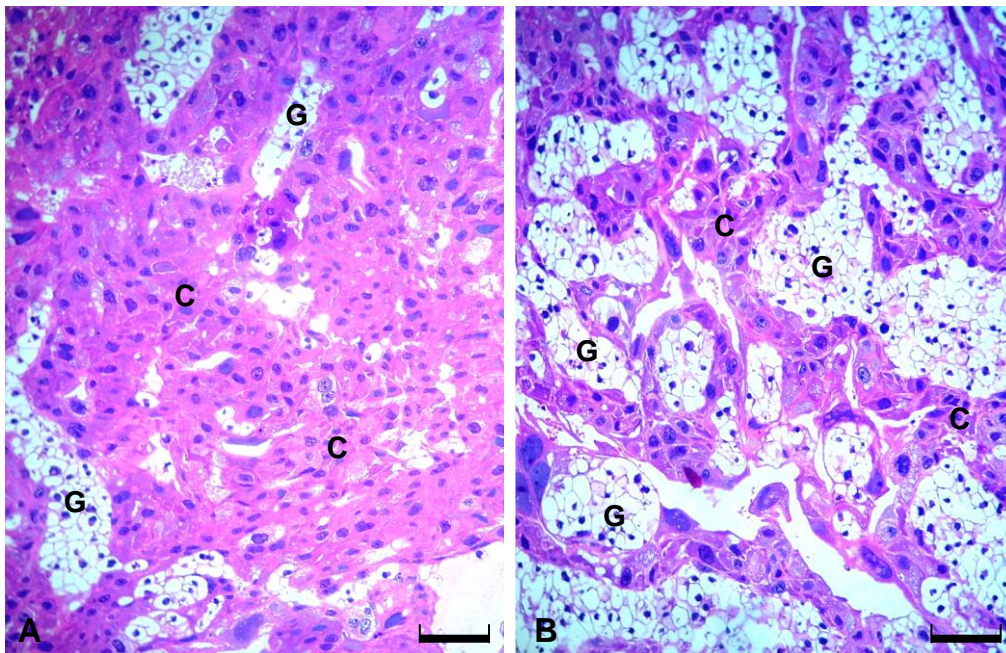


Figura 5. Espongiotrofoblasto, rata, 19 dias de gestação, HE. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto com maior quantidade de células de glicogênio (G) em relação às citotrofoblásticas (C) no grupo hipotireóideo; Barra= 6,4 µm.

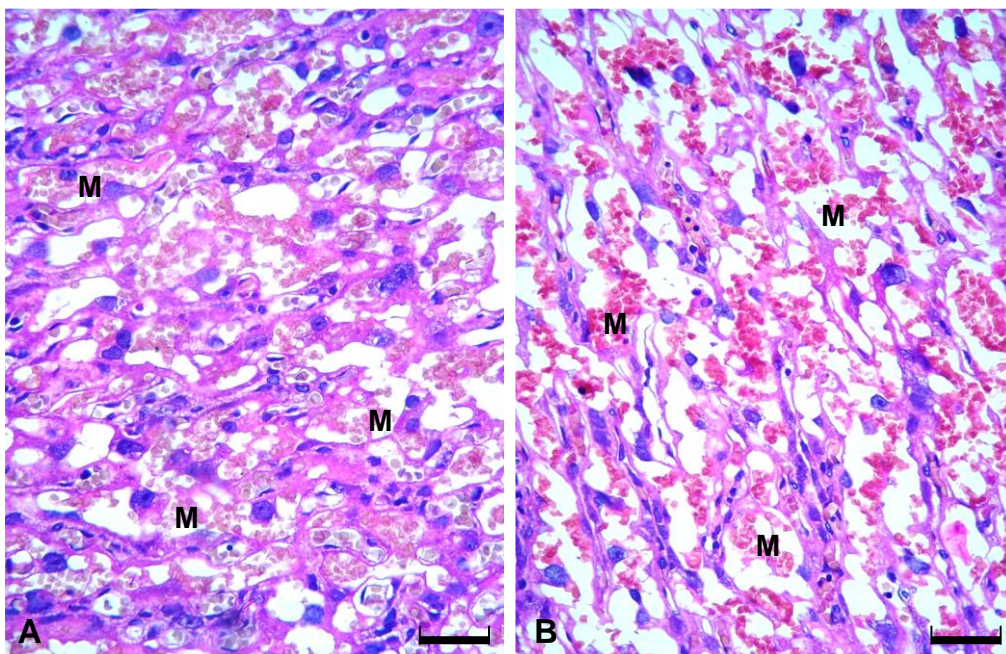


Figura 6. Labirinto placentário, rata, 19 dias de gestação, HE. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Labirinto placentário com dilatação do seio vascular materno (M) no grupo hipotireóideo; Barra=3,2 µm.

Análise imunoistoquímica da placenta

O hipotireoidismo reduziu significativamente a taxa de proliferação, caracterizada pela menor expressão nuclear de CDC-47, aos 14 e 19 dias de gestação nas células gigantes trofoblásticas do sinciotrofoblasto e aos 19 dias no

espongiotrofoblasto da placenta (Tab. 9; Fig. 7 e 8). No labirinto placentário, a expressão de CDC-47 não diferiu significativamente entre grupos aos 14 dias de gestação, mas aumentou significativamente no grupo hipotireóideo em comparação com o controle aos 19 dias (Tab. 9).

Tabela 9. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 nas camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
% células gigantes trofoblásticas com expressão de CDC-47	91,71 ± 1,16 A	79,32 ± 1,39 B
% células do espongiotrofoblasto com expressão de CDC-47	93,42 ± 1,16 A	92,36 ± 1,39 A
% células do labirinto placentário com expressão de CDC-47	99,42 ± 0,30 A	99,35 ± 0,45 A
19 dias		
% células gigantes trofoblásticas com expressão de CDC-47	36,25 ± 5,68 A	23,79 ± 4,62 B
% células do espongiotrofoblasto com expressão de CDC-47	16,62 ± 5,68 A	9,73 ± 4,62 B
% células do labirinto placentário com expressão de CDC-47	17,79 ± 3,97 B	21,10 ± 5,49 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Independentemente do grupo experimental, a placenta apresentou expressão citoplasmática de VEGF nas três camadas (sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário) aos 14 e 19 dias de gestação (Fig. 9).

O sinciotrofoblasto teve intensidade de expressão de VEGF moderada a intensa em algumas células trofoblásticas, com maior expressão desse fator aos 14 dias do que aos 19 dias de gestação nos dois grupos experimentais. Não houve diferença aparente na expressão de VEGF entre grupos.

Nos dois grupos experimentais, o espongiotrofoblasto apresentou expressão heterogênea de VEGF entre suas células aos 14 e 19 dias de gestação, com maior expressão de VEGF nas células de glicogênio do que no citotrofoblasto. O hipotireoidismo reduziu significativamente a área de expressão de VEGF em relação ao grupo controle somente aos 14 dias de gestação (Tab. 10).

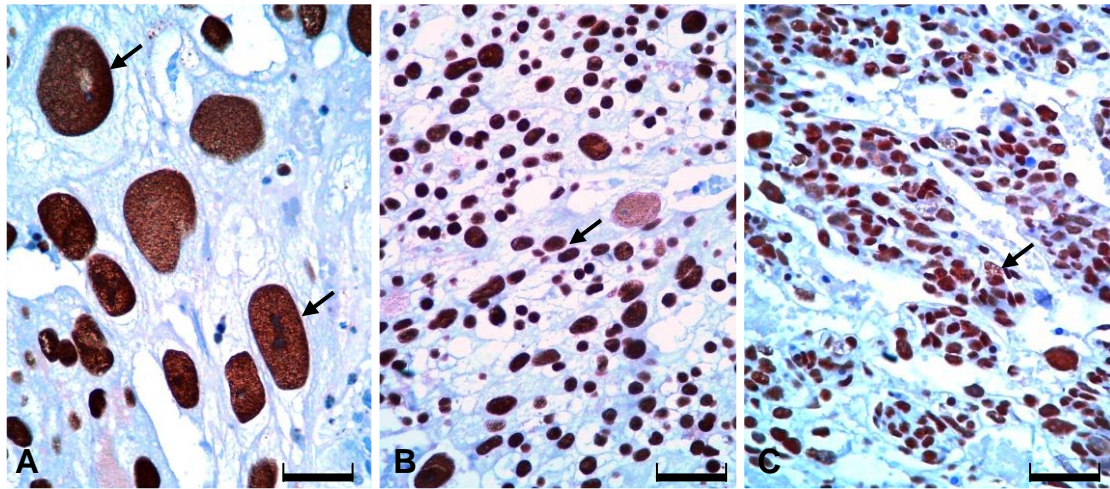


Figura 7. Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Sinciotrofoblasto, espongiotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. Expressão imunistoquímica de CDC-47 nas três camadas do disco placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom (seta); Barra= 3,6 μ m.

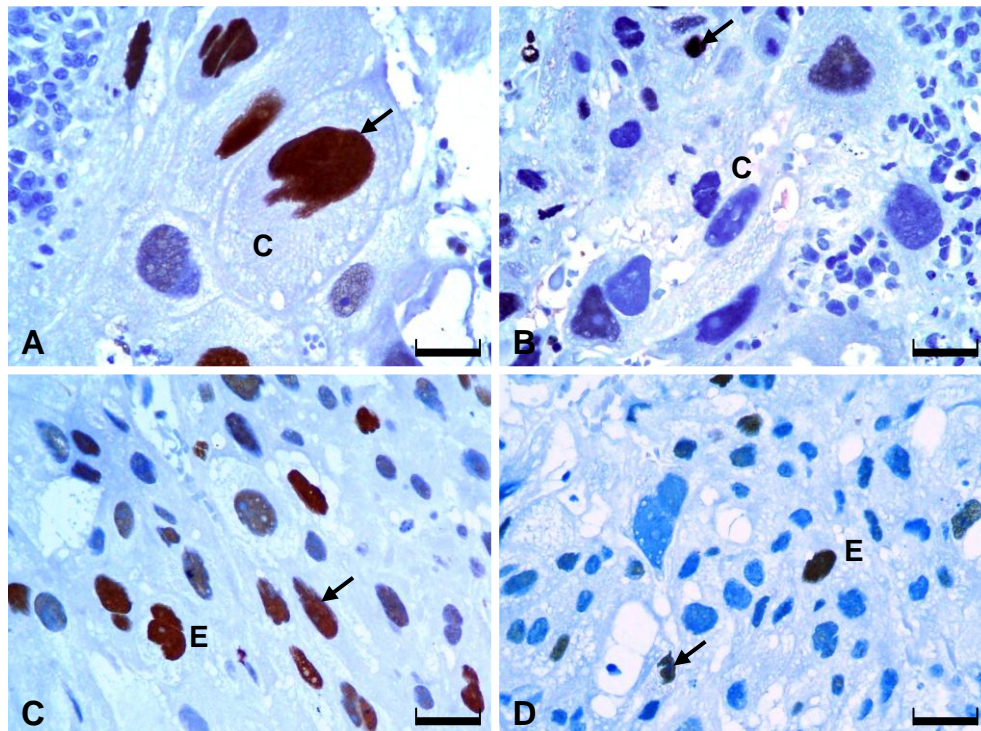


Figura 8. Disco placentário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Sinciotrofoblasto dos grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. C e D) Espongiotrofoblasto dos grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Menor expressão de CDC-47 nas células gigantes trofoblásticas (CG) e nos espongiotrofoblastos (EP) do grupo hipotireóideo em relação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom (seta); Barra= 3,2 μ m.

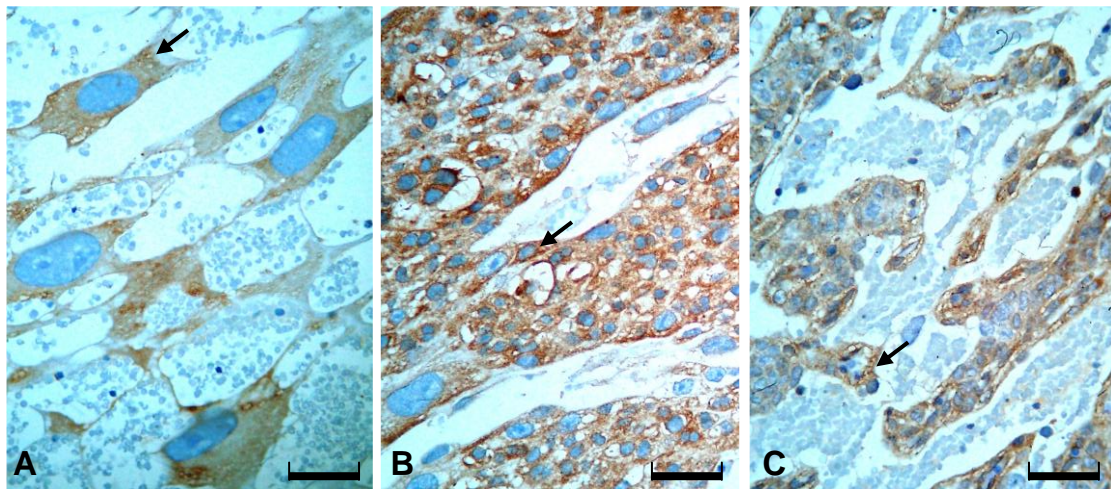


Figura 9. Disco placentário, rata, grupo controle, 14 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A, B e C) Sinciotrofoblasto, espongiosotrofoblasto e labirinto placentário, respectivamente. Expressão imunoistoquímica de VEGF nas três camadas do disco placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 4,3 μ m.

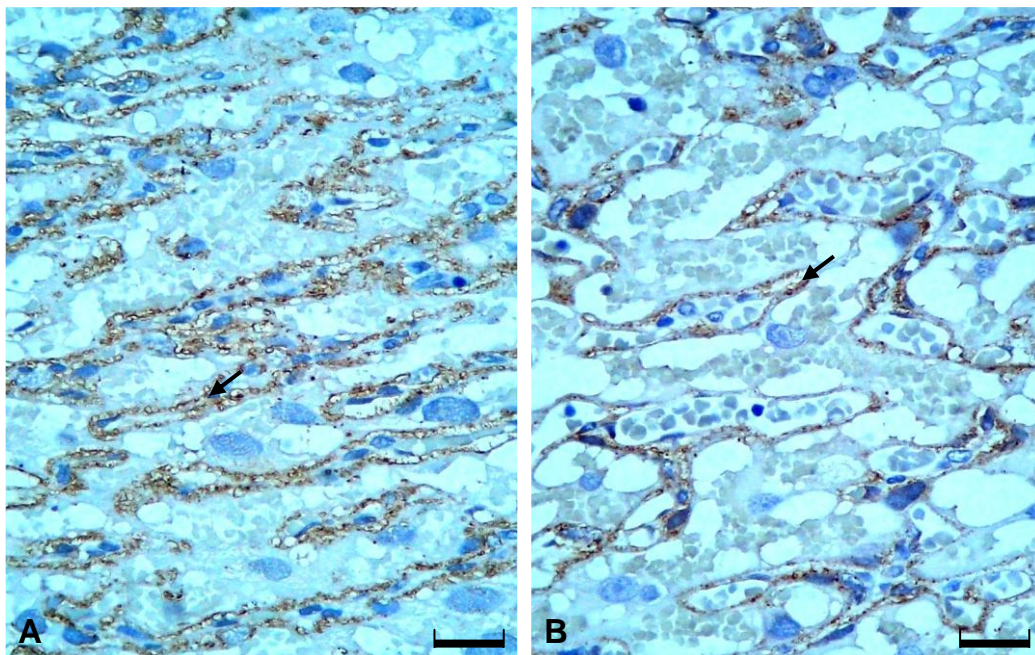


Figura 10. Labirinto placentário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Menor área de expressão de VEGF no labirinto placentário do grupo hipotireóideo em relação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 2 μ m.

No labirinto placentário, em ambos os grupos, a expressão de VEGF foi moderada e uniforme no citoplasma de todas as células trofoblásticas que delimitavam os seios vasculares. Aos 14 dias de gestação, não foi

observada diferença significativa entre grupos. Mas, aos 19 dias, semelhante ao espongiotrofoblasto, o hipotireoidismo reduziu significativamente a área de expressão de VEGF (Tab. 10 e Fig. 10).

Tabela 10. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de área com expressão de VEGF nas camadas do disco placentário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
% área com expressão de VEGF no espongiotrofoblasto	42,29 ± 9,97 A	33,29 ± 4,92 B
% área com expressão de VEGF no labirinto placentário	28,53 ± 5,71 A	29,61 ± 5,25 A
19 dias		
% área com expressão de VEGF no espongiotrofoblasto	47,43 ± 8,75 A	40,40 ± 2,96 A
% área com expressão de VEGF no labirinto placentário	30,62 ± 4,11 A	18,84 ± 4,59 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Avaliação da apoptose na placenta

O espongiotrofoblasto e o labirinto da placenta das ratas hipotireóideas apresentaram aumento significativo do

número de corpos apoptóticos aos 14 dias de gestação em relação ao grupo controle. Já aos 19 dias não houve diferença entre grupos no que concerne ao número de corpos apoptóticos (Tab. 11).

Tabela 11. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo nas camadas do disco placentário nos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Hipotireóideo
14 dias		
Nº corpos apoptóticos/campo no espongiotrofoblasto	0,98 ± 0,57 B	1,55 ± 0,70 A
Nº corpos apoptóticos/campo no labirinto trofoblasto	0,92 ± 0,68 B	1,97 ± 0,89 A
19 dias		
Nº corpos apoptóticos/campo no espongiotrofoblasto	1,78 ± 1,39 A	1,06 ± 0,48 A
Nº corpos apoptóticos/campo no labirinto trofoblasto	0,71 ± 0,63 A	0,51 ± 0,25 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Avaliação histomorfométrica, imunoistoquímica e da técnica de túnel nos corpos lúteos

O peso médio dos ovários, como também o número médio de corpos lúteos/ovário não diferiu entre os grupos aos 14 e 19 dias de gestação (Tab. 12).

O hipotireoidismo reduziu significativamente a taxa de proliferação no corpo lúteo aos 14 dias de gestação. Os corpos lúteos jovens dos ovários das ratas hipotireóideas apresentaram expressão de CDC-47 significativamente menor nas células luteínicas e nas células endoteliais e do pericito em relação ao grupo controle (Tab. 13).

Aos 14 e 19 dias de gestação, as ratas de ambos os grupos apresentaram expressão citoplasmática homogênea e intensa de VEGF nas células luteínicas dos corpos lúteos, sem diferença aparente entre grupos (Fig. 11).

Independentemente do grupo, a expressão de Flk-1 nos corpos lúteos foi discreta e uniforme no citoplasma das células luteínicas. Nas células do pericito e endoteliais, a expressão de Flk-1 era bem mais intensa. Não houve nesse período diferença aparente entre grupos. Mas aos 19

dias de gestação, essa expressão era maior nas células luteínicas em relação aos 14 dias. A expressão de Flk-1 nas células do pericito e endoteliais manteve o mesmo padrão e intensidade observada aos 14 dias. Mas, aos 19 dias, o padrão e a intensidade de expressão de Flk-1 nas células luteínicas e do pericito/endoteliais do grupo hipotireóideo se manteve, sendo a expressão do receptor de VEGF nas células luteínicas das ratas hipotireóideas notavelmente menor do que no grupo controle (Fig. 12).

A expressão de COX-2 nos corpos lúteos era ausente tanto no grupo controle como no hipotireóideo aos 14 dias de gestação. Mas, aos 19 dias de gestação, o grupo controle já apresentava expressão citoplasmática de COX-2 em algumas células luteínicas, ao contrário das ratas hipotireóideas que não apresentaram expressão de COX-2 nos corpos lúteos até os 19 dias de gestação (Fig. 13).

Durante a gestação, independentemente do grupo experimental, a taxa de apoptose no corpo lúteo foi mais expressiva no terço final da gestação em comparação aos 14 dias. Foi nesse período, ou seja, aos 19 dias, que o hipotireoidismo reduziu significativamente o número de corpos apoptóticos no corpo lúteo, em relação ao grupo controle (Tab. 14).

Tabela 12. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso médio dos ovários e número médio de corpos lúteos/ovário dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Normal	Hipotireóideo
14 dias		
Peso do ovário (g)	0,05 ± 0,01 A	0,049 ± 0,006 A
Nº de corpos lúteos/ovário aos 14 dias	6,64 ± 2,41 A	6,85 ± 1,27 A
19 dias		
Peso do ovário (g)	0,06 ± 0,01 A	0,054 ± 0,01 A
Nº de corpos lúteos/ovário aos 19 dias	4,50 ± 2,18 A	5,60 ± 1,68 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 13. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de células com expressão de CDC-47 no corpo lúteo jovem dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Normal	Hipotireóideo
14 dias		
% células luteínicas com expressão de CDC-47	25,56 ± 11,07 A	13,97 ± 5,65 B
% células endoteliais/do pericito com expressão de CDC-47	62,77 ± 12,41 A	52,30 ± 9,48 B
19 dias		
% células luteínicas com expressão de CDC-47	19,32 ± 5,23 A	17,51 ± 5,62 A
% células endoteliais/do pericito com expressão de CDC-47	29,34 ± 9,54 A	32,45 ± 8,72 A

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 14. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de corpos apoptóticos/campo no corpo lúteo dos grupos controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação

Variável	Grupo	
	Normal	Hipotireóideo
Nº de corpos apoptóticos/campo aos 14 dias	0,13 ± 0,34 A	0,062 ± 0,25 A
Nº de corpos apoptóticos/campo aos 19 dias	0,72 ± 0,29 A	0,28 ± 0,18 B

*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

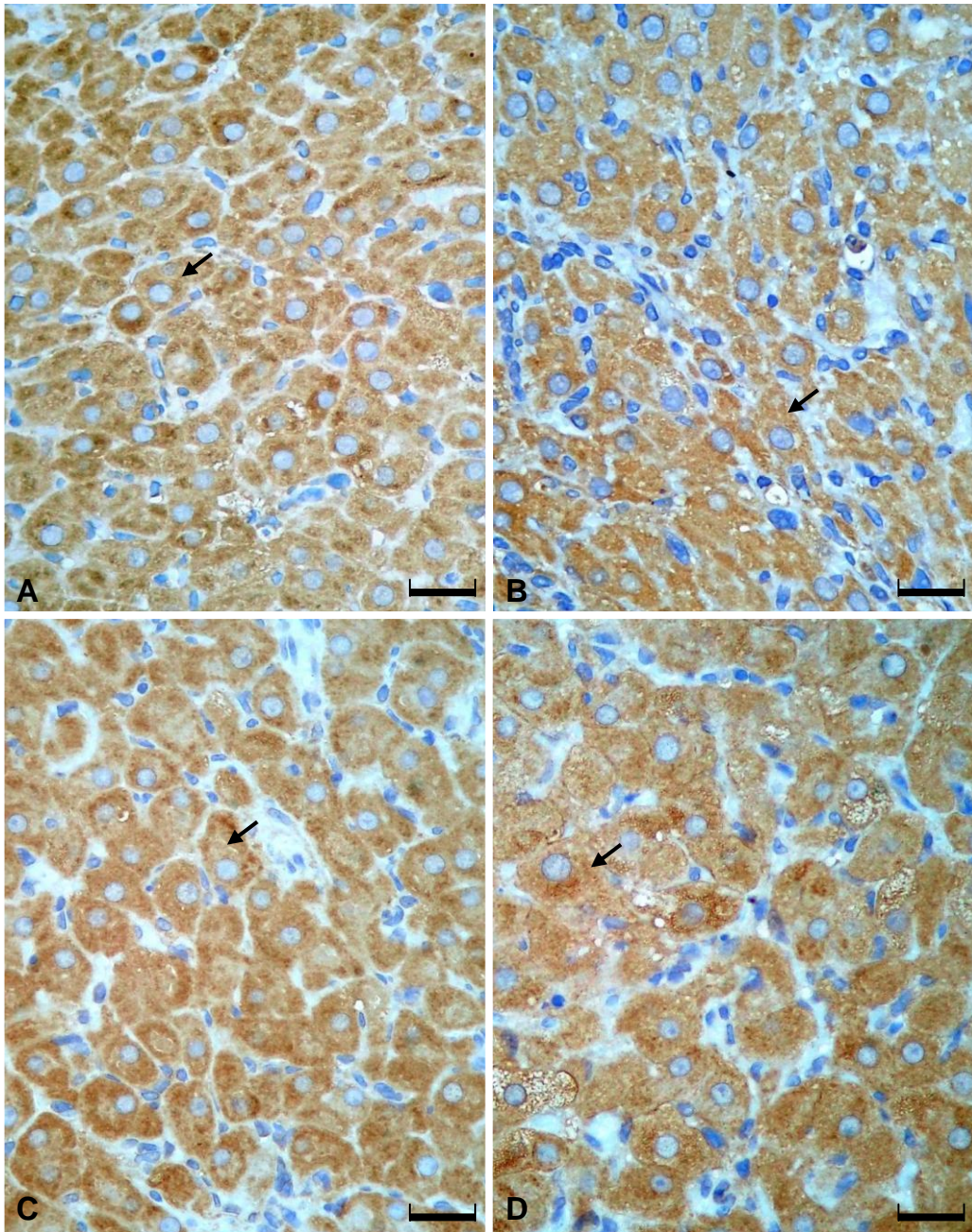


Figura 11. Ovário, rata. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias de gestação, respectivamente. C e D) Grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação, respectivamente. Expressão semelhante, homogênea e acentuada de VEGF nas células luteínicas do grupo controle e hipotireóideo aos 14 e 19 dias de gestação, sem diferença entre grupos. As células imunomarcadas pelo anticorpo VEGF apresentam o citoplasma corado em marrom (seta); Barra= 2 μ m.

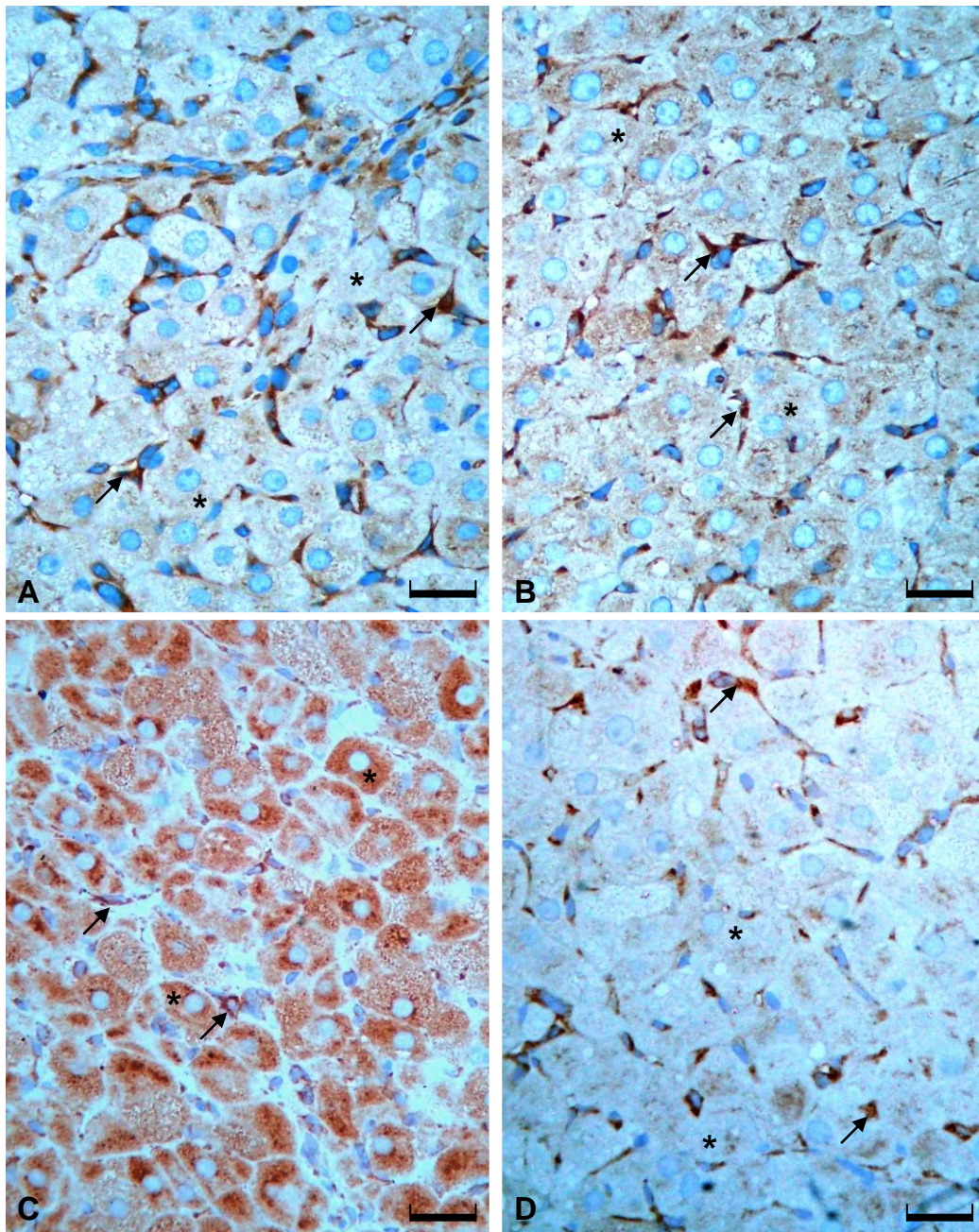


Figura 12. Ovário, rata. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo aos 14 dias de gestação, respectivamente. Expressão intensa de Flk-1 nas células endoteliais e dos pericitos (seta) no grupo controle e hipotireóideo, sem diferença entre grupos. C e D) Grupos controle e hipotireóideo aos 19 dias de gestação, respectivamente. Menor expressão de Flk-1 nas células luteínicas (asterisco) do grupo hipotireóideo em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo Flk-1 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 2 µm.

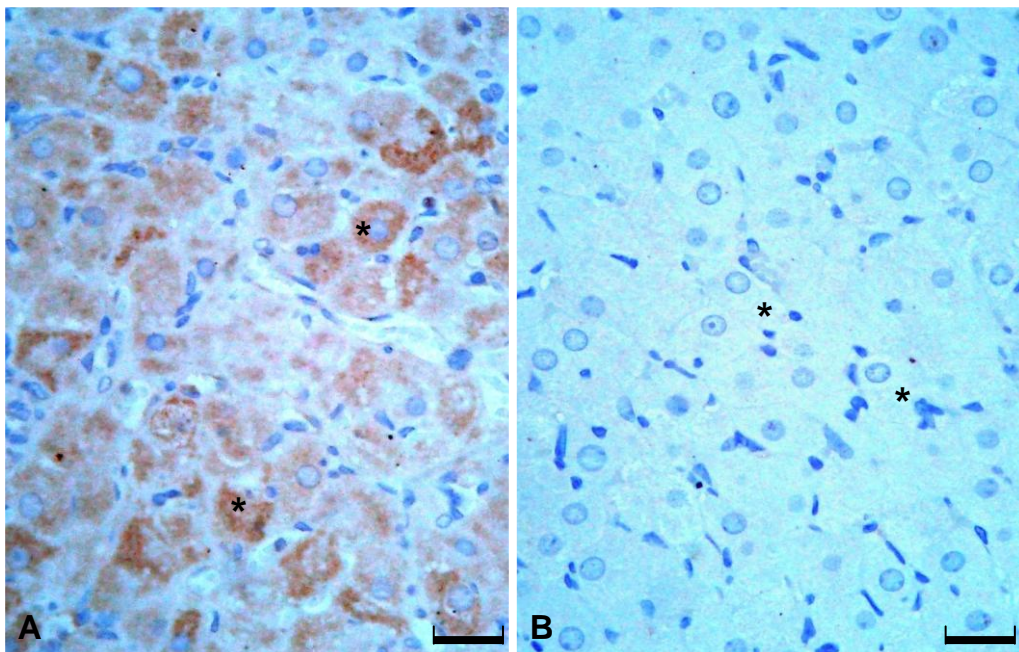


Figura 13. Ovário, rata, 19 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris. A e B) Grupos controle e hipotireóideo, respectivamente. Expressão de COX-2 nas células luteínicas (asterisco) do grupo hipotireóideo ausente em comparação ao controle. As células imunomarcadas pelo anticorpo COX-2 apresentam o citoplasma corado em marrom; Barra= 2 μ m.

DISCUSSÃO

O tratamento das ratas com propiltiouracil foi suficiente não só para induzi-las e mantê-las em estado hipotireóideo, confirmado pelos baixos níveis plasmáticos de T4 livre e pela alteração no peso e na morfologia das tireóides, como também para promover alterações placentárias, ovarianas e fetais durante a gestação. Sendo a placenta um órgão que estabelece a interface materno-fetal para a troca seletiva de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (Cross, 2005), muitas das alterações placentárias, induzidas pelo hipotireoidismo, relatadas neste estudo, podem explicar o porquê do baixo desenvolvimento fetal e serão discutidas em maior detalhe a frente.

O propiltiouracil é uma droga antitireoidiana que afeta a atividade da tireoperoxidase, enzima necessária para o acoplamento das moléculas de iodo às tirosinas, afetando, por conseguinte, a síntese de T3 e T4 (Nunes, 2003). Com isso, o desenvolvimento e a função placentária podem ser comprometidos, uma vez que esse órgão é responsivo aos hormônios tireoidianos por apresentar receptores para eles (Evans *et al.*, 1983; Mukku *et al.*, 1983; Leonard *et al.*, 2001). Além disso, o propiltiouracil inibe a ação da deiodinase 1, necessária para a conversão de T4 em T3, nos tecidos periféricos, inclusive na placenta (Nunes, 2003). Assim, o feto será afetado pelo fato de ser dependente do acúmulo de T3 e T4 no tecido placentário como também da passagem transplacentária desses hormônios, pelo menos até o 16º dia de gestação, pois depois disso seu eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano já é funcional no rato (Choksi *et al.*, 2003).

O hipotireoidismo reduziu o peso da unidade útero-placentária como também dos fetos, sem alterar o número de corpos lúteos e de sítios placentários e a taxa de mortalidade fetal. Esse resultado difere de outros estudos (Pickard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003),

fato que pode ter duas explicações. A primeira pode ter relação com o método usado para indução do hipotireoidismo e a segunda explicação pode ser o tempo de indução antes da cópula. Resultados de pesquisas anteriores demonstram que o hipotireoidismo, induzido pela tireoidectomia, e por mais tempo antes da cópula que o utilizado no presente estudo, reduz a taxa de ovulação e aumenta a mortalidade fetal em ratas (Pickard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003). O uso de propiltiouracil por três meses para indução de hipotireoidismo pode reduzir também a taxa de ovulação (Silva *et al.*, 2004). No entanto, ratas hipotireóideas por tempo longo apresentam transtornos do ciclo estral, mantendo-se em metaestro-diestro por longos períodos, não copulam e tem dificuldade de concepção (dados não publicados). Por isso, o hipotireoidismo foi induzido por somente cinco dias antes da cópula.

Algumas pesquisas já demonstraram que o tempo e o grau de hipotireoidismo induzido em ratas antes ou depois da concepção influenciam no desenvolvimento das alterações reprodutivas (Porterfield *et al.*, 1975; Morreale de Escobar *et al.*, 1985; Bonet e Herrera, 1988; Hendrich e Porterfield, 1992; Leonard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 1999; Pickard *et al.*, 2003). Quando o hipotireoidismo é induzido após a cópula, o tamanho da ninhada não é afetado, ao contrário do crescimento fetal (Hendrich e Porterfield, 1992).

Apesar de o hipotireoidismo reduzir o desenvolvimento fetal, até o presente momento, são poucos os estudos que avaliaram o papel da placenta no comprometimento do desenvolvimento fetal advindos do hipotireoidismo (Shafir *et al.*, 1994; Morrish *et al.*, 1997; Leonard *et al.*, 1999). O que se sabe é que o hipotireoidismo pode afetar a manutenção da gestação por prejudicar a decidualização durante a implantação embrionária (Galton

et al., 2001), por alterar os estoques de glicogênio placentário (Shafir *et al.*, 1994) e por afetar a expressão de c-fos e c-jun em ratas gestantes (Morrish *et al.*, 1997). Contudo, até o momento não se conhecia o efeito do hipotireoidismo na atividade proliferativa, apoptótica e angiogênica da placenta.

O disco placentário corresponde à maior parte da placenta dos roedores e suas camadas estão envolvidas em todos os processos materno-fetais durante a gestação (Cross, 2005). O hipotireoidismo afetou de alguma forma e em maior ou menor intensidade todas essas camadas.

Com relação à camada de células gigantes trofoblásticas ou sinciotrofoblasto, o hipotireoidismo reduziu sua celularidade aos 14 dias de gestação por aumentar a taxa apoptótica do espongiotrofoblasto, uma vez que algumas células dessa camada irão compor a camada de células gigantes trofoblásticas. Em resumo, as células gigantes trofoblásticas se originam do espongiotrofoblasto, e quando essas células migram para essa camada, elas não originam outras células, mas aumentam seu diâmetro e o número de núcleos. A célula gigante trofoblástica é produto da endoreduplicação, ou seja, da divisão do material nuclear sem a ocorrência de mitoses (Cross, 2005).

Sendo assim, embora a camada de células gigantes trofoblásticas tenha apresentado expressão reduzida de CDC-47 aos 14 e 19 dias de gestação, essa redução não implica diretamente em redução do número de mitoses, mas em redução do DNA nuclear com menor formação de núcleos, uma vez que ela é uma célula sincicial (Cross, 2005). A redução das células do sinciotrofoblasto provavelmente é um dos fatores responsáveis pelo menor desenvolvimento fetal causado pelo hipotireoidismo, uma vez que essas células produzem diversos hormônios e citocinas que regulam o fluxo de sangue materno placentário, a produção

de progesterona ovariana, a lactogênese placentária e o nível plasmático de insulina (Cross *et al.*, 2002; Cross, 2005).

Mas, ao contrário do que foi observado aos 14 dias, o hipotireoidismo aumentou a celularidade da camada do sinciotrofoblasto aos 19 dias gestação. Fisiologicamente, a maioria das células gigantes trofoblásticas dessa camada migra para a decídua (Adamson *et al.*, 2002; Cross *et al.*, 2002). Foi demonstrado *in vitro* que a deficiência dos hormônios tireoidianos reduz a expressão de RNAm de metaloproteinase 2 e 3, de fibronectina fetal e de integrinas no trofoblasto extraviloso humano, o que compromete seu potencial invasivo, uma vez que as metaloproteinases são necessárias para desintegrar a matriz extracelular e permitir a migração das células trofoblásticas em direção a decídua (Oki *et al.*, 2004). É provável que essa seja uma das explicações para o aumento do número de células gigantes trofoblásticas na camada do sinciotrofoblasto nos animais hipotireóides aos 19 dias de gestação. No entanto, mais pesquisas são necessárias para estudar a cinética de migração dessas células trofoblásticas em animais hipotireóides. É importante ressaltar que uma redução da invasão trofoblástica com modificação incompleta da parede das artérias espiraladas resulta em estresse oxidativo na placenta, que tem sido implicado na patogênese de muitas complicações da gestação humana, incluindo a pré-eclâmpsia, o aborto espontâneo e o parto prematuro (Burdon *et al.*, 2007).

Embora o hipotireoidismo tenha promovido alterações em todas as camadas do disco placentário, grande parte dessas alterações ocorreu no espongiotrofoblasto. As ratas hipotireóides apresentaram redução na espessura dessa camada aos 14 e 19 dias de gestação, que é justificado não só pela menor taxa proliferativa e celularidade observada nessa camada, como também pelo aumento da apoptose. O espongiotrofoblasto

age como um compartimento glandular endócrino (Cross, 2005). É provável que essas alterações morfológicas no espongiotrofoblasto interfiram com sua síntese de hormônios luteotróficos e lactogênicos durante a gestação. Esses hormônios pertencem à família dos hormônios estruturalmente relacionados à prolactina pituitária (PRL), proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) e citocinas, sendo que a PLP-A promove a ativação de linfócitos uterinos enquanto a PRL mantém a produção de progesterona pelo corpo lúteo (Ain *et al.*, 2003; Malassine *et al.*, 2003; Cross, 2005; Coan *et al.*, 2006). Interessante também é que Freitas *et al.* (2007) trabalhando com ratas gestantes hipertireóideas verificaram um aumento na espessura da camada do espongiotrofoblasto como também aumento da taxa proliferativa, ao contrário do que ocorreu em animais hipotireóideos, demonstrando que os hormônios tireoidianos influenciam de alguma forma a atividade proliferativa dessas células.

Além disso, o comprometimento da formação do espongiotrofoblasto pode prejudicar o desenvolvimento vascular da placenta, uma vez que essa camada limita o crescimento do endotélio materno na placenta fetal através da secreção de fatores anti-angiogênicos, como as proteínas Flt1 e as relacionadas à proliferina (He *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2002). Ao contrário de Voss *et al.* (2000), que verificaram expressão de VEGF somente nas células gigantes trofoblásticas, neste estudo todas as camadas do disco placentário apresentaram expressão do VEGF. No entanto, o hipotireoidismo reduziu a área de expressão de VEGF no espongiotrofoblasto aos 19 dias de gestação, o que por si só já seria suficiente para comprometer o desenvolvimento vascular normal da placenta (Reynolds *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2007).

A maior taxa de apoptose na camada do espongiotrofoblasto nas ratas hipotireóideas

também pode comprometer marcadamente a função dessa camada, já que o aumento da apoptose está associado a distúrbios gestacionais em humanos (Kokawa *et al.*, 1998; Huppertz *et al.*, 2006; Burdon *et al.*, 2007). Em casos de restrição do crescimento intra-uterino (Smith *et al.*, 1997) e pré-eclampsia (Hayakawa *et al.*, 1995) em humanos, e parto prematuro em camundongos (Kakinuma *et al.*, 1997), foi verificado aumento da taxa de apoptose nessas células trofoblásticas.

Interessantemente, também foi encontrado aos 19 dias de gestação no grupo hipotireóideo um desequilíbrio entre as células citotrofoblásticas e as de glicogênio que formam o espongiotrofoblasto, com maior proporção de células de glicogênio, o que corrobora com os resultados de Pickard *et al.* (2003) que observaram maior teor de glicogênio na placenta de ratas hipotireóideas.

Sugere-se que as células de glicogênio, como as células gigantes trofoblásticas, sejam análogas às do trofoblasto extraviloso invasivo humano, isto é, elas invadem as artérias espiraladas maternas que levam sangue ao local de implantação e corroem a parede muscular arterial. Esse processo resulta em aumento do fluxo de sangue, oxigênio e nutrientes para o local da implantação embrionária. Em ratas, as células de glicogênio invadem a decídua materna e podem se fundir ou interagir com as células da glândula "metrial" (células *natural killer* uterinas – uNKs), estimulando as uNKs a modificar as artérias espiraladas (Croy *et al.*, 2000). Uma vez na decídua, as células de glicogênio entram em processo citolítico, liberando seus componentes intracelulares, que incluem o glicogênio e hormônios, no interstício decidual. É provável que esse material seja importante como fonte de energia e para a regulação hormonal da gestação tardia e/ou do feto (Bouillot *et al.*, 2006).

A maior retenção das células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto sugere mais uma vez comprometimento da migração das células trofoblásticas no hipotireoidismo. Esse comprometimento da migração das células de glicogênio também pode ser resultado da menor síntese de metaloproteinases (Oki *et al.*, 2004), comprometendo a migração delas em direção à decídua e prejudicando o desenvolvimento fetal por déficit energético e/ou hematotrófico. Em casos de alteração do desenvolvimento placentário, geralmente há mudança qualitativa no equilíbrio entre as células citotrofoblásticas e as de glicogênio (Milstone *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Coan *et al.*, 2006). No entanto, pelo fato de todas as camadas do disco placentário originarem-se a partir da célula tronco trofoblástica, mais estudos são necessários a fim de verificar se o hipotireoidismo altera o potencial de diferenciação da célula tronco trofoblástica.

Já o aumento da espessura do labirinto placentário no grupo hipotireóideo aos 19 dias de gestação é explicado principalmente pelo aumento significativo da área do seio vascular materno, uma vez que a celularidade estava reduzida tanto aos 14 como aos 19 dias de gestação. O labirinto placentário é a principal área de intercâmbio materno-fetal e a dilatação dos seios vasculares sem aumento do número de vasos é prejudicial à troca de nutrientes, gases e hormônios entre a mãe e o feto. Isso é explicado pois no labirinto placentário um sistema efetivo de trocas hematotróficas se estabelece. Isso ocorre quando no ambiente de contra-corrente, ou seja, fluxo de sangue materno e fetal em sentidos opostos, os feixes de células trofoblásticas se ramificam. A ramificação desses feixes aumenta a área de superfície e maximiza o fornecimento de oxigênio e outros substratos ao sangue venoso umbilical do feto para promover seu desenvolvimento (Cross *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2010).

A redução da celularidade no labirinto placentário nas ratas hipotireóideas pode ser explicado pelo aumento da apoptose nessa camada. Mas, apesar do aumento na atividade proliferativa na camada do labirinto placentário do grupo hipotireóideo aos 19 dias de gestação, a redução de sua celularidade persistiu até o final da gestação. A partir desse resultado, pode-se aventar, mais uma vez, que essa menor celularidade também tenha sido decorrente de falha na migração das células trofoblásticas. A formação do labirinto placentário é dependente da migração inicial das células trofoblásticas provenientes do cone ectoplacentário e depois por células provenientes do sinciotrofoblasto e espongiotrofoblasto (Cross, 2005).

Além disso, o hipotireoidismo reduziu a área de expressão de VEGF no labirinto placentário aos 19 dias de gestação, o que poderia comprometer a angiogênese nessa camada. Três das patologias mais comuns na gestação de humanos, representadas pelo retardo do crescimento intra-uterino, aborto espontâneo e pré-eclâmpsia, parecem estar associadas com alterações no desenvolvimento vascular da placenta. Essas mudanças podem ser reflexo de uma alteração na regulação gênica dos fatores angiogênicos placentários. Curiosamente, muitos desses defeitos estão ligados a alterações na expressão do VEGF (Redmer *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2006; Luther *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008). Esses estudos destacam que o defeito de um único gene pode ser suficiente para impedir o desenvolvimento vascular normal da placenta e, assim, comprometer a gestação (Cross *et al.*, 2002).

Mais interessante ainda é que o hipotireoidismo reduziu a área ocupada pelo capilar fetal no labirinto placentário aos 14 dias de gestação, sugerindo que a invasão dos vasos fetais no disco placentário pode ter sido insuficiente para estabelecer as

trocas gasosas com o sangue materno e tenha participado na gênese do baixo desenvolvimento fetal.

Ratas gestantes hipotireóideas apresentam atraso no parto com prolongamento da fase luteal (Rosato *et al.*, 1998). Mas, a despeito disso, não há estudos que tenham avaliado a atividade proliferativa, apoptótica, angiogênica e a expressão de COX-2 no corpo lúteo de ratas gestantes hipotireóideas. Semelhante ao observado no corpo lúteo de ratas não gestantes, nas ratas gestantes, o hipotireoidismo também reduziu a taxa proliferativa das células luteínicas, endoteliais e do pericito nos corpos lúteos aos 14 dias e reduziu também a apoptose aos 19 dias de gestação. Essa redução da taxa apoptótica ao final da gestação pode explicar o porquê do prolongamento da fase luteal em ratas gestantes hipotireóideas (Rosato *et al.*, 1998). Além disso, o hipotireoidismo também retardou a expressão de COX-2 nas células luteínicas aos 19 dias de gestação, o que poderia retardar a síntese de PGF_{2α} e, por conseguinte, a luteólise. É provável que a redução de COX-2 explique também a redução do número de corpos apoptóticos encontrado neste estudo e o atraso no parto relatado anteriormente (Rosato *et al.*, 1998).

Contudo, embora a queda dos níveis plasmáticos de progesterona nas espécies domésticas seja importante para a ocorrência do parto, a sua queda por si só não dá início ao parto e sim a liberação de cortisol pela adrenal do feto (Cunningham, 2004).

É possível que o atraso no parto de animais com hipotireoidismo também seja resultado da liberação inadequada de cortisol pelo feto, já que os fetos das ratas hipotireóideas foram menores com desenvolvimento talvez insuficiente para a maturação e função adequada da adrenal (Kalantaridou *et al.*, 2010). Além disso, a placenta dos animais hipotireóideos apresentou alterações em seu desenvolvimento e sua formação que

poderiam comprometer a ocorrência do parto (Kalantaridou *et al.*, 2010).

A placenta é importante na produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) que estimula a produção de dehidroepiandrosterona, precursor do cortisol, pela adrenal do feto (Sirianni *et al.*, 2005). Em gestações com restrição do crescimento intra-uterino há alteração dos níveis de CRH e da expressão do seu receptor, o que levanta a hipótese de que essas alterações estejam envolvidas na patofisiologia do crescimento intra-uterino inadequado (Kalantaridou *et al.*, 2010).

As células luteínicas dos animais hipotireóideos apresentaram redução intensa na expressão do Flk-1, receptor do VEGF, aos 19 dias de gestação, sem alteração na expressão do VEGF. A redução da expressão do Flk-1 nessas células levanta a suspeita de que sua expressão aumente quando a célula está mais susceptível a um processo degenerativo ou morte. Primeiro, porque as células luteínicas dos animais controle apresentaram forte expressão de Flk-1 aos 19 dias de gestação, período em que elas já estavam sofrendo luteólise. Segundo, como observado no experimento anterior, também houve aumento da expressão de Flk-1 nos corpos lúteos maduros e em regressão em relação aos corpos lúteos jovens. Além disso, entre as várias ações do VEGF, ele apresenta atividade anti-apoptótica (Kaczmarek *et al.*, 2005; Abramovich *et al.*, 2006), e talvez por isso essas células aumentem a expressão de Flk-1 para que o VEGF possa atuar, desacelerando seu processo degenerativo. No entanto, mais estudos são necessários a fim de verificar qual é a relação entre a expressão de Flk-1 com a viabilidade celular no corpo lúteo.

CONCLUSÕES

O hipotireoidismo induzido nas condições do presente estudo reduz significativamente o peso fetal sem alterar a taxa de mortalidade fetal.

O hipotireoidismo induzido compromete todas as camadas da placenta da rata; aumenta a população de células de glicogênio na camada do espongiotrofoblasto em relação às células citotrofoblásticas; interfere no desenvolvimento vascular do labirinto placentário e reduz a atividade proliferativa e a celularidade e aumenta a taxa apoptótica das três camadas do disco placentário.

O hipotireoidismo reduz a atividade proliferativa, apoptótica e angiogênica e a expressão da ciclooxigenase-2 no corpo lúteo de ratas gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERDEEN, G.W.; WIEGAND, S.J.; BONAGURA, T.W. et al. Vascular endothelial growth factor mediates the estrogen-induced breakdown of tight junctions between and increase in proliferation of microvessel endothelial cells in the baboon endometrium. *Endocrinology*, v.149, p.6076-6083, 2008.
- ABRAMOVICH, D.; PARBORELL, F. e TESONE, M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biology of Reproduction*, v.75, p.434-441, 2006.
- ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; e MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early *corpus luteum* in cows. *Reproduction*, v.125, p.759-767, 2003.
- ADAMSON, S.L.; LU, Y.; WHITELEY, K.J. et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental Biology*, v.250, p.358-373, 2002.
- ADRIAN, C. e MARTIN, S.J. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*, v.26, p.390-397, 2001.
- AIN, R.; CANHAM, L.N. e SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental biology*, v.260, p.176-190, 2003.
- AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. e SKOTTNER, A. Immunohistochemical aspects of insulin-like growth factors I and II in the bovine *corpus luteum*. *Journal of reproduction and fertility*, v.101, p.445-451, 1994.
- ANTHONY, R.V.; SCHEAFFER, A.N.; WRIGHT, C.D. et al. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reproduction Supplement*, v. 61, p.183-194, 2003.
- AREIA, A.L.; VARELA, M.G.; TORGAL, I. e OLIVEIRA, C.F. Hiperandrogenismo. *Revista Iberoamericana de fertilidad*, v.23, 2006.
- ARFUSO, F. e MEYER, G.T. Apoptosis does not affect the vasculature of the *corpus luteum* of pregnancy in the rat. *Apoptosis*, v.8, p.665-671, 2003.
- ARICI, A.; ORAL, E.; BUKULMEZ, O. et al. Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Endocrinology*, v.137, p.3762-3769, 1996.
- ARMANT, D.R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic development program of trophoblast cells. *Develop. Biol.*, v.280, p.260-280, 2005.
- ARMSTRONG, L.C. e BORNSTEIN, P. Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, v.22, p.63-71, 2003.
- AROSH, J.A.; BANU, S.K.; CHAPDELAIN, P. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in *corpus luteum*: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology*, v.145, p.2551-2560, 2004.

- ATTIA, A.H.; YOUSSEF, D.; HASSAN, N.; EL-MELIGUI, M.; KAMAL, M.; AL-INANY, H. Subclinical hyperthyroidism as a potential factor for dysfunctional uterine bleeding. *Gynecological Endocrinology*, v.2, p. 65 – 68, 2007.
- AUSTIN, E.J.M.; MIHM, A.C.O.; EVANS, P.G. et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.839-848, 2001.
- AVDALIAN, A.M.; BOBROV, I.P.; KLIMACHEV, V.V. et al. Sex hormones receptor expression and the activity of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region in the intact myometrium cells and in uterine leiomyoma. *Morfologija*, v.137, p.61-65, 2010.
- BAMBERGER, A.M.; MINAS, V.; KALANTARIDOU, S.N. et al. Corticotropin-releasing hormone modulates human trophoblast invasion through carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 regulation. *American Journal of Pathology*, v.168, p.141-150, 2006.
- BAYLESS, K.J. e DAVIS, G.E. Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. *Biochemical and biophysical research communications*, v.312, p.903-913, 2003.
- BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A. et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproduction of Biology*, v.8, p.179-211, 2008.
- BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A. et al. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, v.138, p.195-209, 2009.
- BAZER, F.W.; WU, G.; SPENCER, T.E. et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction*, v.16, p.135-152, 2010.
- BEG, M.A.D.R.; BERGFELT, K.; KOT, M.C. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-441, 2001.
- BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L. et al. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Molecular Human Reproduction*, v.12, p.593-599, 2006.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M. et al. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biology of reproduction*, v.63, p.1106-1114, 2000.
- BIANCO, F.; BASINI, G.; GRASSELLI, F. e TAMANINI, C. PO2 in swine follicular fluid. *Reproduction*, v.30, p.58, 2003.
- BISHOP, D.W. *Sperm physiology in relation to the oviduct*. In: HAFEZ, E. S. E.; BLANDAU, R. J. The mammalian oviduct: comparative biology and methodology. Chicago: University of Chicago Press, 1969. cap.9, p. 231-250.
- BONET, B. e HERRERA, E. Different response to maternal hypothyroidism during the first and second half of gestation in the rat. *Endocrinology*, v.122, p.450-455, 1988.

- BOONYAPRAKOB, U.; GADSBY, J.E.; HEDGPETH, V. *et al.* Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig *corpora lutea* during the oestrous cycle. *Reproduction*, v.126, p.393-405, 2003.
- BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; JOHNSON, M.L. *et al.* Placental growth throughout the last two-thirds of pregnancy in sheep: Vascular development and angiogenic factor expression. *Biology of Reproduction*, v.76, p.259-267, 2007.
- BOUILLOT, S.; RAMPON, C.; TILLET, E. *et al.* Tracing the Glicogen Cells with Protocadherin 12 during mouse placenta development. *Placenta*, v.27, p.882-888, 2006.
- BRAR, A.K.; HANDWERGER, S.; KESSLER, C.A. *et al.* Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiological genomics*, v.7, p.135-148, 2001.
- BRAVERMAN, L.E. e UTIGER, R.D. Introduction to hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 719-721, 2000.
- BURDON, C.; MANN, C.; CINDROVA-DAVIES, T. *et al.* Oxidative stress and the induction of cicloxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta. *Placenta*, v.28, p.724-733, 2007.
- BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; JAEGER, L.A. *et al.* Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface in domestic animals. *Cells, tissues, organs*, v.172, p.202-217, 2002.
- CALVO, R.; OBREGON, M.J. e DEL REY, F.E. The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal thyroid status. *Endocrinology*, v.131, p.357-365, 1992.
- CARAMBULA, S.F.; MATIKAINEN, T.; LYNCH, M.P.; FLAVELL, R.A.; GONÇALVES, P.B.; TILLY, J.L.; RUEDA, B.R. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology*, v.143, p.1495-1501, 2002.
- CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine*, v.7, p.575-583, 2001.
- CELIK-OZENCI, C.; AKKOYUNLU, G.; KAYISLI, U.A.; ARICI, A.; DEMIR, R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochemistry and cell biology*, v.120, p. 383-390, 2003.
- CHAN, S. e KILBY, M.D. Thyroid hormone and central nervous system development. *Journal of Endocrinology*, v.165, p.1-8, 2000.
- CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P. e MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*, v.25, p.103-113, 2004.
- CHEUNG, C.Y. Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary. *Endocrinology*, v.113, p.632-638, 1983.
- CHOKSI, N.Y.; JAHNKE, G.D.; HILAIRE, C.S. *et al.* Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive

- health. *Birth Defects Research*, v.68, p.479-491, 2003.
- CHRISTENSEN, S.; VERHAGE, H.G.; NOWAK, G. et al. Smooth muscle myosin II and alpha smooth muscle actin expression in the baboon (*Papio anubis*) uterus is associated with glandular secretory activity and stromal cell transformation. *Biology of Reproduction*, v.53, p.598-608, 1995.
- CHUN, S.Y.; BILLIG, H.; TILLY, J.L. et al. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, v.135, p.1845-1853, 1994.
- CHUN, S.Y.; EISENHAUER, K.M.; KUBO, M. et al. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*, v.136, p.3120-3127, 1995.
- CHUN, S.Y.; EISENHAUER, K.M.; MINAMI, S. et al. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: folliclestimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, v.137, p.1447-1456, 1996.
- CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; SHARKEY, A.M. et al. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Human Reproduction*, v.11, p.1090-1098, 1996.
- COAN, P.M.; CONROY, N.; BURTON, G.J. et al. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Developmental dynamics*, v.235, p.3280-3294, 2006.
- CORREIA-DA-SILVA, G.; BELL, S.C.; PRINGLE, J.H. et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta*, v. 25, p. 538-547, 2004.
- CRAVEN, C.M.; MORGAN, T. e WARD, K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, v.19, p.241-252, 1998.
- CROSS, J. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice - a review. *Placenta*, v.26, p.S3-S9, 2005.
- CROSS, J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, v.11, p.105-113, 2000.
- CROSS, J.C.; HEMBERGER, M.; LU, Y. et al. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Molecular and cellular endocrinology*, v.187, p.207-212, 2002.
- CROY, B.A.; ASHKAR, A.A.; MINHAS, K. et al. Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v.7, p.12-20, 2000.
- CROY, B.A.; CHANTAKRU, S.; ESADEG, S. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). *Journal of reproductive immunology*, v.57, p.151-168, 2002.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Guanabara Koogan, 3 ed., p.385-399, 2004.
- CURRY, T.E. e OSTEEEN, K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocrine reviews*, v. 24, p.428-465, 2003.

- DAVIS, B.J.; LENNARD, D.E.; LEE, C.A. et al. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 β . *Endocrinology*, v.140, p.2685-2695, 1999.
- DAVIS, J.S.; RUEDA, B.R. e SPANEL-BOROWSKI, K. Microvascular endothelial cells of the *corpus luteum*. *Reproductive biology and endocrinology*, v.1, p.89, 2003.
- DELGADO, S.R.; MCBEY, B.A.; YAMASHIRO, S. et al. Accounting for the parturition loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *Journal of leukocyte biology*, v.59, p.262-269, 1996.
- DIJKSTRA, G.; ROOIJ, D.G.; JONG, F.H. et al. Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, v.134, p.649-654, 1996.
- DIXON, R.M.; REID, S.W.J.; MOONEY, C.T. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Veterinary Record*, v.145, p.481-487, 1999.
- DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.
- DOUGLAS, N.C.; TANG, H.; GOMEZ, R. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Reproduction Development*, v.150, p.3845-3854, 2009.
- DUFFY, D.M. e STOUFFER, R.L. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *Molecular Human Reproduction*, v.7, p.731-739, 2001.
- DUNCAN, W.C.; DRIESCHE, S. e FRASER, H.M. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology*, v.149, p.3313-3320, 2008.
- DUPRESSOIR, A.; MARCEAU, G.; VERNOCHE, C. et al. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, p.725-730, 2005.
- DUPRESSOIR, A.; VERNOCHE, C.; BAWA, O. et al. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.106, p.12127-12132, 2009.
- EBISCH, I.M.W.; THOMAS, C.M.G.; WETZELS, A.M.M.; WILLEMSSEN, W.N.; SWEEP, F.C.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertility and Sterility*, v.90, p. 2340-50, 2008.
- EGGAN, K.; JURGA, S.; GOSDEN, R. et al. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, v.441, p.1109-1114, 2006.
- EL-NEFI AWY, N.; ABDEL-HAKIM, K. e KANAYAMA, N. The selective prostaglandin EP4 agonist, APS-999 Na, induces follicular growth and maturation in the rat ovary. *European Journal of Endocrinology*, v.152, p.315-323, 2005.
- ERICKSON, G.F.; NAKATANI, A.; LING, N. et al. Insulin-like growth factor binding

- protein-3 gene expression is restricted to involuting *corpora lutea* in rat ovaries. *Endocrinology*, v.133, p.1147-1157, 1993.
- ESCOBAR, M.L.; ECHEVERRIA, O.M.; ORTIZ, R. et al. Combined apoptosis and autophagy, the process that eliminates the oocytes of atretic follicles in immature rats. *Apoptosis*, v.13, p.1253-1266, 2008.
- EVANS, K.W.; FARWELL, A.P. e BRAVERMAN, L.E. Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, v.113, p.1459-1463, 1983.
- FAXEN, M.; NASIELL, J.; LUNELL, N.O.; BLANCK, A. Differences in RNAm expression of endothelin-1, c-fos and c-jun in placentas from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. *Gynecol Obstet Invest*, v.44, p.93-96, 1997.
- FAZLEABAS, A.T.; KIM, J.J. e STRAKOVA, Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment—a review. *Placenta*, v.25, p.S26-S31, 2004.
- FITKO, R. e SZLEZYNGIER, B. Role of thyroid hormone in controlling the concentration of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in rat ovaries. *European journal of endocrinology*, v.130, p.378-80, 1994.
- FRANK, N.; SOJKA, J.; MESSER, N.T. Equine thyroid dysfunction. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, v.18, p.305-319, 2002.
- FRASER, H.M. e DUNCAN, W.C. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. *Reproduction, Fertility and Development*, v.21, p.377-392, 2009.
- FRASER, H.M. e LUNN, S.F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *British Medical Bulletin*, v.56, p.787-797, 2000.
- FRASER, H.M. e LUNN, S.F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction*, v.121, p.355-362, 2001.
- FREEMAN, M.E. *The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat*. In: *The Physiology of Reproduction*, 2 ed. Raven Press, Ltd. New York, p. 613-648, 1994.
- FREITAS, E.S.; LEITE, E.D.; SOUZA, C.A. et al. Histomorphometry and expressions of Cdc-47 and Caspase-3 in hyperthyroid rats uteri and placentas during gestation and postpartum associated with fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p. 498-509, 2007.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v.294, p.1871-1875, 2001.
- GAETJE, R. IGF-1 and EGF influence on steroid secretion and morphology of human granulosa cells of IVF-cycles and natural cycles in vitro. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, v.21, p.14-23, 1994.
- GALTON, V. A.; MARTINEZ, E.; HERNANDEZ, A. et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*, v. 142, n. 5, 2001.
- GARDNER, R.M.; KIRKLAND, J.L.; IRELAND, J.S. et al. Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. *Endocrinology*, v.103, p.1164-1172, 1978.
- GAYTÁN, M.; BELLIDO, C.; MORALES, C. et al. Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipooxygenase pathways in follicle rupture

- and ovulation in the rat. *Reproduction*, v.132, p.571-577, 2006.
- GEORGIADES, P.; WATKINS, M.; BURTON, G.J. et al. Roles for genomic imprinting and the zygote genome in placental development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p.4522-4527, 2001.
- GEVA, E. e JAFFE, R.B. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstetrical & gynecological survey*, v.55, p.511-519, 2000.
- GHOSH, P.; SAHA, S.K.; NANDI, S.S.; BHATTACHARYA, S.; ROY, S.S. Involvement of pitx2, a homeodomain transcription factor in hypothyroidism associated reproductive disorders. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v.20, p.887-898, 2007.
- GILLESPIE, V.; BAER, K.; FARRELLY, J. et al. Canine gastrointestinal stromal tumors: immunohistochemical expression of CD34 and examination of prognostic indicators including proliferation markers Ki67 and agnor. *Veterinary Pathology*, 2010 (online)
- GOFF, A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, v.71, p.11-6, 2004.
- GOMEZ, R.; SIMON, C.; REMOHI, J. et al. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hypermeability, *Biology of Reproduction*, v.68, p.2164-2171, 2003.
- GOS, T.; KRELL, D.; BIELAU, H. et al. Demonstration of disturbed activity of external globus pallidus projecting neurons in depressed patients by the AgNOR staining method. *Journal of affective disorders*, v.119, p.149-155, 2009.
- GOSPODAROWICZ, D. Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clinical orthopaedics*, v.257, p.231-248, 1990.
- GRASSELLI, F.; BASINI, G.; TIRELLI, M. et al. Angiogenic activity of porcine granulosa cells cocultured with endothelial cells in a microcarrierbased three-dimensional fibrin gel. *Journal of physiology and pharmacology*, v.54, p.361-370, 2003.
- GREENAWAY, J.; CONNOR, K.; PEDERSEN, H.G. et al. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*, v.145, p.2896-2905, 2004.
- GREENWALD, G.S. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Growth Factors*, v.12, p.131-144, 1989.
- GU, Y.; JOW, G.M.; MOULTON, B.C. et al. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrinology*, v.135, p.1272-1279, 1994.
- GUILLOMOT, M.; FLÉCHON, J.E. e LEROY, E. *Blastocyst development and implantation*. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. *Reproduction in Mammals and Man*. Paris, 1993. cap.20, p.387-412.

- GUIMOND, M.J.; LUROSS, J.A.; WANG, B. et al. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biology of Reproduction*, v.56, p.169-79, 1997.
- GUO, K.; WOLF, V.; DHARMARAJAN, A.M.; FENG, Z.; BIELKE, W.; SAURER, S.; FRIIS, R. Apoptosis-associated gene expression in the *corpus luteum* of the rat. *Biology of reproduction*, v.58, p.739-746, 1998.
- HAFEZ, E.S.E. *Anatomy of female reproduction*. In: *Reproduction in farm animals*. 6.ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.2, p.20-55.
- HAPON, M.B.; SIMONCINI, M.; VIA, G. et al. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction*, v.126, p.371-382, 2007.
- HARVEY, C.B. e WILLIAMS, G.R. Mechanism of thyroid action. *Thyroid*, v.12, p.441-446, 2002.
- HATSUTA, M.; ABE, K.; TAMURA, K. et al. Effects of hypothyroidism on the estrus cycle and reproductive hormones in mature female rat. *European Journal of Pharmacology*, v.486, p.343-348, 2004.
- HAYAKAWA, S.; WATANABE, K. e SATOH, K. Increased apoptosis and repair hyperplasia in preeclamptic placenta. *Placenta*, v.16, p. 2, 1995.
- HAYASHI, K.G.; ACOSTA, T.J.; TETSUKA, M. et al. Involvement of angiopoietin-Tie system in bovine follicular development and atresia: messenger RNA expression in theca interna and effect on steroid secretion. *Biology of reproduction*, v.69, p.2078-2084, 2003.
- HE, Y.; SMITH, S.K.; DAY, K.A. et al. Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-RNA is important for the regulation of VEGF activity. *Molecular endocrinology*, v.13, p.537-545, 1999.
- HEAZELL, A.E.P.; CROCKER, I.P. Live and Let Die – Regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta*, v.29, p. 772–783, 2008.
- HEMBERGER, M. e CROSS, J.C. Genes governing placental development. *Trends in endocrinology and metabolism*, v.12, p.162-168, 2001.
- HENDRICH, C.E. e PORTERFIELD, S.P. Serum growth hormone levels in hypothyroid and GH-treated thyroidectomized rats and their progenies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.201, p.296-302, 1992.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, v.407, p.770-776, 2000.
- HIRASHIMA, M.; LU, Y.; BYERS, L. et al. Trophoblast expression of fms-like tyrosine kinase 1 is not required for the establishment of the maternal-fetal interface in the mouse placenta. *Developmental Biology*, v.100, p.15637-15642, 2003.
- HSU, S.Y. e HSUEH, A.J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian paradigm. *Physiological Reviews*, v.80, p.593-614, 2000.
- HUNIGEN, H.; BISPLINGHOFF, P.; PLENDL, J. e BAHRAMSOLTANI, M. Vascular dynamics in relation to immunolocalisation of VEGF-A, VEGFR-2 and Ang-2 in the bovine *corpus luteum*. *Acta histochemica*, v.110, p.462-472, 2008.

- HUANG, A.; SUN, D.; KOLLER, A. et al. 17 Beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation*, v.101, p. 94-100, 2000.
- HUPPERTZ, B.; KADYROV, M. e KINGDOM, J.C.P. Apoptosis and its role in the trophoblast. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.195, p.29-39, 2006.
- HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary:molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v.11, p.162-177, 2005.
- IDRIS, I.; SRINIVASAN, R.; SIMM, A. AND PAGE, R. C. Maternal hypothyroidism in early and late gestation: effects on neonatal and obstetric outcome. *Clinical Endocrinology*, v.63, p. 560-565, 2005.
- IMAKAWA, K.; CHANG, K. e CHRISTENSON, R.K. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *Journal of Reproduction and Development*, v.50, p.155-169, 2004.
- INUWA, I.; WILLIAMS, M.A. Morphometric study on the uterine horn and thyroid gland in hypothyroid, and thyroxine treated hypothyroid rats. *Journal of anatomy*, v.188, p.383-393, 1996.
- ISHIZAKI, Y.; JACOBSON, M.D. e RAFF, M.C. A role for caspases in lens fiber differentiation. *The Journal of cell biology*, v.140, p.153-158, 1998.
- JABBOUR, H.N.; SALES, K.J.; SMITH, O.P. et al. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Molecular and cellular endocrinology*, v.252, p.191-200, 2006.
- JACKSON, M.R.; CARNEY, E.W.; LYE, S.J. et al. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placentae throughout gestation. *Placenta*, v.15, p.341-353, 1994.
- JAHNKE, G.; NICHOLSON, G.; GREELEY, G.H. et al. Studies of the neural mechanisms by which hypothyroidism decreases prolactin secretion in the rat. *Brain Research*, v.191, p.429- 441, 1980.
- JAMES, S.R.; FRANKLYN, J.A.; KILBY, M.D. Placental transport of thyroid hormone. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n.2, p. 253-264, 2007.
- JIANG, J.Y.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B.K. e SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction*, v.125, p.211-223, 2003.
- JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W.; BURGHARDT, R.C. et al. Conceptus-uterus interactions in pigs: Endometrial gene expression in response to estrogens and interferons from conceptuses. In: *Control of Pig Reproduction VIII*. Nottingham University Press, p.321-332. 2009.
- JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; JOYCE, M.M. et al. Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1951-1958, 2003.
- JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T. et al. Germline stem cells and follicular

- renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 2004.
- JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A. et al. Effects of estradiol-17 β on expression of RNAm for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine*, v.30, p.333-342, 2006.
- JOSWIG, A.; GABRIEL, H.; KIBSCHULL, M. et al. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reproductive biology and endocrinology*, v.1, 44-53, 2003.
- JUNQUEIRA, L.C.U. e CARNEIRO, J. *Aparelho reprodutor feminino*. In:___ *Histologia basica*. 8. ed. Rio de Janeiro: c1995. Cap. 22, p.367-388.
- KACZMAREK, M.M.; SCHAMS, D. e ZIECIK, A.J. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview. *Biology of reproduction*, v.5, p.111-136, 2005.
- KAIPIA, A. e HSUEH, A.J.W. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annual Review of Physiology*, v.59, p.349-363, 1997.
- KAKINUMA, C.; KUVAYAMA, C.; KAGA, N. et al. Trophoblast apoptosis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor. *Obstetrics and gynecology*, v.90, p.117-124, 1997.
- KALANTARIDOU, S.N.; ZOUMAKIS, E.; MAKRIGIANNAKIS, A. et al. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *Journal of Reproductive Immunology*, v.85, p.33-39, 2010.
- KANEKO, J.J. Thyroid function. In: Kaneko JJ, editor. *Clinical biochemistry of domestic animals*. New York: Academic Press, Inc. p. 634-635, 1989.
- KARABINAS, C.D. e TOLIS, G.J. Thyroid disorders and pregnancy. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, v.18, p.509-515, 1998.
- KASHIWAGI, A.; DIGIROLAMO, C.M.; KANDA, Y. et al. The postimplantation embryo differentially regulates endometrial gene expression and decidualization. *Endocrinology*, v.148, p.4173-4184, 2007.
- KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. e CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, v.25, p.114-126, 2004.
- KENNEDY, T.G.; GILLIO-MEINA, C. e PHANG, S.H. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*, v.134, p.635-643, 2007.
- KIM, J.J.; JAFFE, R.C. e FAZLEABAS, A.T. Insulin-like growth factor binding protein-1 expression in baboon endometrial stromal cells: regulation by filamentous actin and requirement for de novo protein synthesis. *Endocrinology*, v.140, p.997-1004, 1999.
- KIRKLAND, J.L.; GARDNER, R.M.; MUKKU, V.R. et al. Hormonal control of uterine growth: the effect of hypothyroidism on estrogen-stimulated cell division. *Endocrinology*, v.108, p.2346-2350, 1981.
- KISLIOUK, T.; LEVY, N.; HURWITZ, A. et al. Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v.88, p.3700-3707, 2003.

- KOBAYASHI, S.; ACOSTA, T.J.; OZAWA, T. *et al.* Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during *corpora lutea* development in the cow: effect of vasoactive peptides. *Biology of reproduction*, v.66, p.174-179, 2002.
- KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M. *et al.* Production and localisation of angiotensin II in the bovine early *corpus luteum*: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2a. *The Journal of endocrinology*, v.170, p.369-380, 2001.
- KOKAWA, K.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*, v. 19, p.21-26, 1998.
- KÖNNIG, H.E. e AMSELGRUBER, W. Vaskularisation des *Corpus luteum* des Rindes. *Fertilitat*, v.2, p.205-208, 1986.
- KOSAKA, N.; SUDO, N.; MIYAMOTO, A. e SHIMIZU, T. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.363, p.733-737, 2007.
- KRASSAS, G.E. Thyroid disease and female reproduction. *Fertility and sterility*, v.74, p.1063-1070, 2000.
- LECOUTER, J.; KOWALSKI, J.; FOSTER, J. *et al.* Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, v.412, p.877-884, 2001.
- LEE, P.D.K.; GIUDICE, L.C.; CONOVER, C.A. *et al.* Minireview: Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *Society for Experimental Biology and Medicine*, v.216, p.319-357, 1997.
- LEONARD, A. J.; PICKARD, M. R.; SINHA, A. K. *et al.* Maternal thyroid dysfunction and c-fos and c-jun expression in rat placenta. *Placenta*, v.20, p.727-731, 1999.
- LEONARD, A.J.; EVANS, I.M.; PICKARD, M.R. *et al.* Thyroid hormone receptor expression in rat placenta. *Placenta*, v.22, p.353-359, 2001.
- LEONARD, J.L. e KOEHRLE, J. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p 136-173, 2000.
- LESSEY, B.A.; CASTELBAUM, A.J.; SAWIN, S.W. Aberrant integrin expression in the endometrium of women with endometriosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v.79, p.643-649, 1994.
- LI, J.; KIM, J.; LISTON, P. *et al.* Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology*, v.139, p.1321-1328, 1998.
- LI, W.; CHALLIS, J.R. Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v.90, p.6569-6574, 2005.
- LIM, H. e DEY, S.K. A novel pathway of prostacyclin signaling hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology*, v.143, p.3207-3210, 2002.

- LIU, J.; CARRIERE, P.D.; DORE, M. et al. Prostaglandin G/H synthase- 2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, v.57, p.1524-1531, 1997.
- LIU, K.; FENG, Q.; GAO, H.J. et al. Expression and regulation of plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor type-1, and steroidogenic acute regulatory protein in the rhesus monkey corpus luteum. *Endocrinology*, v.144, p.3611-3617, 2003.
- LONGCOPE, C. The male and female reproductive systems in hypothyroidism. In: Braverman, L.E., R.D. (Ed.), *The Thyroid: A fundamental and Clinical Test*. 6.ed. J.B. Lippincott, Philadelphia, 1991, p.1052-1055.
- LUTHER, J.; AITKEN, R.; MILNE, J. et al. Maternal and fetal growth, body composition, endocrinology, and metabolic status in undernourished adolescent sheep. *Biology of Reproduction*, v.77, p.343-350, 2007.
- MAISONPIERRE, P.C.; SURI, C.; JONES, P.F. et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, v.4, p.55-60, 1997.
- MALASSINE, A.; FRENDO, J.L. e EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update*, v.9, p.531-539, 2003.
- MANN, C.A.; HEMPSTOCK, J.; CHARNOCK-JONES, D.S. et al. Oxidative stress and apoptosis in the labyrinth of the normal mouse placenta increase with gestational age. *Placenta*, v.24, p.A.21, 2003.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, v. 62. p. 609-614, 2002.
- MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R. et al. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, v.123, p.23-30, 2002.
- MARTELLI, A.; PALMERINI, M.G.; RUSSO, V. et al. Blood vessel remodeling in pig ovarian follicles during the periovulatory period: an immunohistochemistry and SEM-corrosion casting study. *Reproductive, Biology and Endocrinology*, v.16, p.72, 2009.
- MARTINEZ-CHEQUER, J.C.; STOUFFER, R.L.; HAZZARD, T.M. et al. Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles. *Biology of reproduction*, v.68, p.1112-1118, 2003.
- MARUO, T.; HAYASHI, M.; MATSUO, H. et al. The role of thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in the functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, v.121, p.1233-1241, 1987.
- MATSUMOTO, H.; MA, W.; SMALLEY, W. et al. Diversification of cyclooxygenase-2-derived prostaglandins in ovulation and implantation. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1557-1565, 2001.
- MATTHEIJ, J.A.M.; SWARTS, J.J.M.; LOKERSE, P. et al. Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. *Endocrinology*, v.146, p.87-94, 1995.
- MAURO, T.; KATAYAMA, K.; BARNEA, E.R.; MOCHIZUKI, M. A role for thyroid

- hormone in the induction of ovulation and corpus luteum function. *Hormone Research*, v. 37, p. 12-18, 1992.
- MAYNARD, S.E.; MIN, J.; MERCHAN, J. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sflt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *The Journal of clinical investigation*, v.111, p.649-658, 2003.
- McGEE, E.A.; CHUN, S.Y.; LAI, S. et al. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertility and Sterility*, v.71, p.732-738, 1999.
- MI, S.; LEE, X.; LI, X. et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, v.403, p.785-789, 2000.
- MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.M. et al. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biology of Reproduction*, v.63, p.811-819, 2000.
- MILSTONE, D.S.; REDLINE, R.W.; O'DONNELL, P.E. et al. E-selectin expression and function in a unique placental trophoblast population at the fetal-maternal interface: regulation by a trophoblast-restricted transcriptional mechanism conserved between humans and mice. *Developmental dynamics*, v.219, p.63-76, 2000.
- MODLICH, U.; KAUP, F.J. e AUGUSTIN, H.G. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Laboratory investigation*, v.74, p.771-780, 1996.
- MONTUENGA, L.M.; MARTINEZ, A.; MILLER, M.J. et al. Expression of adrenomedullin and its receptor during embryogenesis suggests autocrine or paracrine modes of action. *Endocrinology*, v.138, p.440-451, 1997.
- MORREALE DE ESCOBAR, G.; PASTOR, R.; OBREGÓN, M.J. et al. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*, v.117, p.1890-1900, 1985.
- MORRISH, D.W.; DAKOUR, J.; LI, H. et al. In vitro cultured human term cytotrophoblast: a model for normal primary epithelial cells demonstrating a spontaneous differentiation programme that requires EGF for extensive development of syncytium. *Placenta*, v.18, p.577-885, 1997.
- MUKKU, V.R.; KIRKLAND, J.L.; HARDY, M. et al. Evidence for thyroid hormone receptors in uterine nuclei. *Metabolism*. v.32, p.142-145, 1983.
- MÜLLER, K.; ELLENBERGER, C. e SCHOON ,H.A. Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. *Research in veterinary science*, v.87, p.421-431, 2009.
- MURAKAMI, M. e KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Progress in lipid research*, v.43, p.3-35, 2004.
- MURPHY, C.R. The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, v.27, p.1-66, 1993.
- MURRAY, A.A.; MOLINEK, M.D.; BAKER, S.J. et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction*, v.121, p.89-96, 2001.

- NAKAO, N.; ONO, H. e YOSHIMURA, T. Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction*, v.136, p.1-8, 2008.
- NEUVIANS, T.P.; SCHAMS, D.; BERISHA, B. e PFAFFL, M.W. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2 α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biology of reproduction*, v.70, p.473-480, 2004.
- NICOSIA, R.F. e VILLASCHI, S. Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall. *International review of cytology*, v.185, p.1-43, 1999.
- NISWENDER, G.D. e NETT, T.M. *The corpus luteum and its control*. In: *The Physiology of Reproduction*, p. 489-525, 1988.
- NUNES, M. T. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.47, p. 639-643, 2003.
- OKI, N.; MATSUO, H.; NAKAGO, S. *et al.* Effects of 3,5,3'-Triiodothyronine on the invasive potencial and the expression of the integrins and matrix metalloproteinases in cultured early placental extravillous trophoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.89, p.5213-5221, 2004.
- OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction*, v.53, p. 295-301, 1995.
- OKUDA, K.; KORZEKWA, A.; SHIBAYA, M. *et al.* Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, v.71, p.2065-2071, 2004.
- OLIVEIRA, S.F.; GRECA, C.P.S.; ABRAHAMSOHN, P.A. *et al.* Organization of desmin-containing intermediate filaments during differentiation of mouse decidual cells. *Histochemistry and cell biology*, v.113, p.319-327, 2000.
- OLIVEIRA, T.S., NUNES, V.A., NASCIMENTO, E.F. *et al.* Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, p.448-456, 2005.
- OLSON, D.M. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, v.17, p.717-730, 2003.
- ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J. *et al.* Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular developmental from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*, v.20, p.2456-2468, 2006.
- O'SHEA, J.D.; CRAN, D.G. e HAY, M.F. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. *Cell and tissue research*, v.210, p.305-319, 1980.
- PARBORELL, F.; IRUSTA, G.; CELÍN, A.R. *et al.* Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs. *Molecular Reproduction and Development*, v.75, p.623-631, 2008.
- PARIA, B.C.; REESE, J.; DAS, S.K. *et al.* Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*, v.296, p.2185-2188, 2002.
- PELUFFO, M.C.; BUSSMANN, L.; STOUFFER, R.L. *et al.* Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous

- cycle. *Reproduction*, v.132, p.465-475, 2006.
- PEPPER, M.S.; MANDRIOTA, S.J.; JELTSCH, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *Journal of cellular physiology*, v.177, p.439-452, 1998.
- PERKS, C.M. e WATHES, D.C. Expression of RNAs for insulin-like growth factor binding proteins-2, -3 and -4 in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *The Journal of endocrinology*, v.151, p.241-249, 1996.
- PICKARD, M.R.; LEONARD, A.J.; OGILVIE, L.M. *et al.* Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise. *Journal of Endocrinology*, v.176, p.247-255, 2003.
- PICKARD, M.R.; SINHA, A.K.; OGILVIE, L. *et al.* Maternal hypothyroxinemia influences glucose transporter expression in fetal brain and placenta. *Journal of Endocrinology*, v.163, p.385-394, 1999.
- PIOSIK, P.A.; VAN GROENIGEN, M.; VAN DOORN, J. Effects of maternal thyroid status on thyroid hormones and growth in congenitally hypothyroid goat fetuses during the second half of gestation. *Endocrinology*, v.138, p.5-11, 1997.
- PLAISIER, M.; DENNERT, I.; ROST, E. *et al.* Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Human Reproduction*, v.24, p.185-197, 2009.
- PLAISIER, M.; RODRIGUES, S.; WILLEMS, F. *et al.* Different degrees of vascularisation and their relation to the expression of VEGF, PlGF, angiopoietins and their receptors in first-trimester decidua. *Fertility and sterility*, v.88, p.176-187, 2007.
- PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anatomia, histologia, embryologia*, v.29, p.257-266, 2000.
- PLENDL, J.; NEUMUFFILLER, C. e SINOWATZ, F. Differences between endothelial cells isolated from the corpus luteum of the estrous cycle and the *corpus luteum* of pregnancy. *Biologie cellulaire*, v.87, p.179-188, 1996.
- PON, Y.L. e WONG, A.S. Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the beta-catenin/T-cell factor signaling pathway. *Molecular Endocrinology*, v.20, p.3336-3350, 2006.
- POPOVICI, R.M.; KAO, L.C. e GIUDICE, L.C. Discovery of new inducible genes in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, v.141, p.3510-3513, 2000.
- POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Human Reproduction Update*, v.9, n. 2, p.149-161, 2003.
- POPPE, K.; VELKENIERS, B.; GLINOER, D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nature Clinical Practice: Endocrinology & Metabolism*, v.4, p. 394 – 405, 2008.
- PORTERFIELD, S.P.; WHITTLE, E. e HENDRICH, C.E. Hypoglycemia and glycogen deficits in fetuses of hypothyroid pregnant rats. *Proceedings of the Society for*

- Experimental Biology and Medicine*, v.149, p.748–753, 1975.
- PSYCHOYOS, A. Endocrine control of egg implantation. In *Handbook of Physiology*, p187–215. Ed. RO Greep, EG Astwood & SR Geiger. Washington, DC: American Physiological Society. 1973.
- QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M. et al. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science*, v.82, p.40-52, 2004.
- RAMPON, C.; PRANDINI, M.H.; BOULLOT, S. et al. Protocadherin 12 (VEcadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Experimental cell research*, v.302, p.48-60, 2005.
- RAO, K.M.K. e COHEN, H.J. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutation research*, v.256, p.139-148, 1991.
- REDMER, D.A. e REYNOLDS, L.P. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of Reproduction*, v.1, p.182–192, 1996.
- REDMER, D.A.; AITKEN, R.P.; MILNE, J.S. et al. Influence of maternal nutrition on messenger rna expression of placental angiogenic factors and their receptors at mid-gestation in adolescent sheep. *Biology of Reproduction*, v.72, p.1004-1009, 2005.
- REDMER, D.A.; DORAISWAMY, V.; BORTNEM, B.J. et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine *corpus luteum*. *Biology of reproduction*, v.65, p.879-889, 2001.
- REYMOND, M.J.; BENOTTO, W. e LEMARCHAND-BERAUD, T. The secretory activity of the tuberoinfundibular dopaminergic neurons is modulated by the thyroid status in the adult rat: consequence on prolactin secretion. *Neuroendocrinology*, v.46, p.62-68, 1987.
- REYNOLDS, L.P. e REDMER, D.A. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *Journal of animal science*, v.76, p.1671-1681, 1998.
- REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S. et al. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *The International Journal of Developmental Biology*, v.54, p.355-365, 2010.
- REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; VONNAHME, K.A. et al. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta*, v.26, p.689-708, 2005.
- REYNOLDS, L.P.; CATON, J.S.; REDMER, D.A. et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *The Journal of physiology*, v.572, p.51-58, 2006.
- REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T. e REDMER, D.A. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *International Journal of Experimental Pathology*, v.83, p.151-163, 2002.
- REYNOLDS, L.P.; GRAZUL-BILSKA, A.T. e REDMER, D.A. Angiogenesis in the *corpus luteum*. *Endocrine*, v.12, p.1-9, 2000.
- ROBBINS, J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.105-120, 2000.
- ROBINSON, R.S.; WOAD, K.J.; HAMMOND, A.J. et al. Angiogenesis and

- vascular function in the ovary. *Reproduction*, v.138, p.869-881, 2009.
- ROBKER, R.L.; RUSSELL, D.L.; ESPEY, L.L. et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p.4689-4694, 2000.
- ROGERS, P.A. e ABBERTON, K.M. Endometrial arteriogenesis: vascular smooth muscle cell proliferation and differentiation during the menstrual cycle and changes associated with endometrial bleeding disorders. *Microscopy research and technique*, v.60, p.412-419, 2003.
- ROSATO, R.R.; GIMENEZ, M.S. e JAHN, G.A. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta Endocrinology*, v.127, p.547-54, 1992.
- ROSATO, R.R.; JAMMES, H. e JAHN, G.A. Effect of chronic thyroxine treatment on pregnancy in rats: effects on oestrogen, progesterone, prolactin and GH receptors in uterus, liver and mammary gland. *Endocrine research*, v.24, p.269-284, 1998.
- ROSS, D.S. Subclinical hypothyroidism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's, the thyroid*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1001-1007, 2000.
- ROTHCHILD, I. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Progress in Hormone Research*, v.37, p.183-298, 1981.
- RUSS, A.P.; WATTLER, S.; COLLEDJE, W.D. et al. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*, v.404, p.95-99, 2000.
- SAHA, S.K.; GHOSH, P.; KONAR, A. et al. Differential expression of procollagen lysine 2-oxoglutarate 5-deoxygenase and matrix metalloproteinase isoforms in hypothyroid rat ovary and disintegration of extracellular matrix. *Endocrinology*, v.146, p.2963-2975, 2005.
- SAKURAI, T.; TAMURA, K. e KOGO, H. Vascular endothelial growth factor increases Messenger RNAs encoding cyclooxygenase-II and membrane-associated prostaglandin E synthase in rat luteal cells. *Journal of Endocrinology*, v.183, p.527-533, 2004.
- SAKURAI, T.; TAMURA, K.; KOGO, H. Stimulatory effects of eicosanoids on ovarian angiogenesis in early luteal phase in cyclooxygenase-2 inhibitor-treated rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 516, p. 158-164, 2005.
- SAKURAI, T.; TAMURA, K.; OKAMOTO, S. et al. Possible role of cyclooxygenase II in the acquisition of ovarian luteal function in rodents. *Biology of Reproduction*, v.69, p.835-842, 2003.
- SALAMONSEN, L.A.; NIE, G. e FINDLAY, J.K. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *Journal of reproductive immunology*, v.53, p.215-225, 2002.
- SALVETTI, N.; PANZANI, C.G.; GIMENO, E.J. et al. An imbalance between apoptosis and proliferation contributes to follicular persistence in polycystic ovaries in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.7, 2009.
- SAVION, S.; LEPSKY, E.; ORENSTEIN, H. et al. Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.47, p.118-127, 2002.
- SCANLON, M.F. e TOFT, A.D. Regulation of thyrotropin secretion In: Braverman LE,

- Utiger RD, editors. Werner and Ingbar's, the thyroid, 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.234-253, 2000.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M. *et al.* Possible role of growth hormone, IGFs, and IGF-binding proteins in the regulation of ovarian function in large farm animals. *Domestic animal endocrinology.*, v.17, p.279-285, 1999.
- SCHUTTE, B. e RAMAEKERS, F.C.S. Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. *Progress in cell cycle research*, v.4, p.207-217, 2000.
- SEGI, E.; HARAGUCHI, K.; SUGIMOTO, Y. *et al.* Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and ciclooxigenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. *Biology of Reproduction*, v.68, p.804-811, 2003.
- SENTMAN, C.L.; MEADOWS, S.K.; WIRA, C.R. *et al.* Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *Journal of immunology*, v.173, p.6760-6766, 2004.
- SERAKIDES, R. Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas. 2001a. 90f. *Tese* (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E.F.; RIBEIRO, A.F.C.; SILVA, C.M. Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v.45, p.258-264, 2001.
- SHAFRIR, E.; BARASH, V.; ZEDERMAN, R. *et al.* Modulation of fetal and placental metabolic pathways in response to maternal thyroid and glucocorticoid hormone excess. *Israel Journal of Medical Sciences*, v. 30, p. 32-41, 1994.
- SHERER, D.M. e ABULAFIA, O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta*, v.22, p.1-13, 2001.
- SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB reports*, v.41, p.278-286, 2008.
- SHIMIZU, T. e SATO, E. Manipulation of ovarian follicle development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. *Reproductive Biology*, v.5, p.257-268, 2005.
- SHIMIZU, T.; JIANG, J.Y.; SASADA, H. e SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biology of reproduction*, v.67, p.1846-1852, 2002.
- SHIMIZU, T.; KAWAHARA, M.; ABE, Y. *et al.* Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *Journal of Reproduction and Development*, v.49, p.181-192, 2003.
- SHYNLOVA, O.; OLDENHOF, A.; DOROGIN, A. *et al.* Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biology of Reproduction*, v.74, p.839-849, 2006.
- SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T.S. *et al.* Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, p.628-639, 2004.

- SIMPSON, K.S.; BYERS, M.J.; CURRY JR., T.E. Spatiotemporal messenger ribonucleic acid expression of ovarian tissue inhibitors of metalloproteinases throughout the rat estrous cycle. *Endocrinology*, v.142, p. 2058-2069, 2001.
- SIRIANNI, R.; MAYHEW, B.A.; CARR, B.R. et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) and urocortin act through type 1 CRH receptors to stimulate dehydroepiandrosterone sulfate production in human fetal adrenal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 90, p.5393-5400, 2005.
- SIROIS, J. e DORE, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase- 2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology*, v.138, p.4427-4434, 1997.
- SIROIS, J.; LIU, J.; BOERBOOM, D. et al. *Prostaglandins and ovulation: from indomethacin to PGHS-2 knockout*. In Adashi EY (ed) *Ovulation: Evolving Scientific and Clinical Concepts*. Springer, New York, p.208-220, 2000.
- SIROIS, J; SAYASITH, K; BROWN, K.A. et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human reproduction update*, v.10, p.373-385, 2004.
- SLAYDEN, O.D. e KEATOR, C.S. Role of progesterone in nonhuman primate implantation. *Seminars in reproductive medicine*, v.25, p.418-430, 2007.
- SLOT, K.A.; VOORENDT, M.; DE BOER-BROUWER, M. et al. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *Journal of Endocrinology*, v.188, p.179-192, 2006.
- SMITH, G.C.S. e WEAR, H. The perinatal implications of angiogenic factors. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v.21, p.111-116, 2009.
- SMITH, M.F.; MCINTOSH, E.W. e SMITH, G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of animal science*, v.72, p.1857-1872, 1994.
- SMITH, M.F.; RICKE, W.A.; BAKKE, L.J.; DOW, M.P.D.; SMITH, G.W. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.191, p. 45-56, 2002.
- SMITH, S.C.; BAKER, P.N. e SYMONDS, E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, v.177p.57-65, 1997.
- SMITH, S.K. Angiogenesis and implantation. *Human reproduction*, v.15, p.59-66, 2000.
- SMITH, W.L. e MARNETT, L.J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochimica et biophysica acta*, v.1083, p.1-17, 1991.
- SOARES, M.J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reproductive biology and endocrinology*, v.2, p.51, 2004.
- SOUZA, C.; OCARINO, N.; SILVA, J. et al. Administration of thyroxine affects the morphometric parameters and VEGF expression in the uterus and placenta and the uterine vascularization but does not affect reproductive parameters in gilts during early gestation. *Reproduction in domestic animals*, v.46, p.e7-e16, 2011.
- SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reproduction*,

- Fertility and Developmental*, v.19, p.65-78, 2007.
- SPICER, L. J., HAMILTON, T.D. e KEEFER, B.E. Insulin-like growth factor 1 enhancement of steroidogenesis by bovine granulosa cells and thecal cells: dependence on de novo cholesterol synthesis. *The Journal of endocrinology*, v.151, p.365-373, 1996.
- STOUFFER, R.L.; MARTINEZ-CHEQUER, J.C.; MOLSKNESS, T.A. *et al.* Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of medical research*, v.32, p.567-575, 2001.
- STRADTMAN, E.W. *Thyroid dysfunction and ovulatory disorders*. In: Carr, B.R., Blackwell, R.E. (Eds.), *Textbook of Reproductive Medicine*. Appleton, Norwalk, p. 297-321, 1993.
- STYNE, D.M. Puberty. In: Greenspan FS (Ed), *Basic and Clinical Endocrinology*. Appleton, Lange & Norwalk, London, 1991, p.519-542.
- SUGAWARA, A. e ITO, S. Stimulatory effects of angiotensin II on angiogenesis. *Nippon Rinsho*, v.64, p.67-69, 2006.
- SVENSSON, E.C.; MARKSTROM, E.; ANDERSSON, M. *et al.* Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biology of Reproduction*, v.63, p.1457-1464, 2000.
- SVENSSON, E.C.; MARKSTROM, E.; SHAO, R. *et al.* Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertility and sterility*, v.76, p.1225-1231, 2001.
- TAKIGUCHI, S.; SUGINO, N.; ESATO, K. *et al.* Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biology of Reproduction*, v.70, p.313-318, 2004.
- TAMANINI, C. e AMBROGI, M. Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reproduction in domestic animals*, v.39, p.206-216, 2004.
- TANAKA, S.; KUNATH, T.; HADJANTONAKIS, A.K. *et al.* Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, v.282, p.2072-2075, 1998.
- TANI, Y.; MORI, Y.; MIURA, Y. *et al.* Molecular cloning of the rat thyroxine-binding globulin gene and analysis of its promoter activity. *Endocrinology*, v.135, p.2731-2736, 1994.
- TASSEL, W.; SLATER, M.; BARDEN, J.A. *et al.* Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. *The Histochemical Journal*, v.32, p.373-379, 2000.
- TAYA, K. e SASAMOTO, S. Inhibitory effects of corticotropin-releasing factor and h-endorphin on LH and FSH secretion in the lactating rat. *Journal of Endocrinology*, v.120, p.509-515, 1989.
- TAYLOR, P.D.; HILLIER, S.G. e FRASER, H.M. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *Journal of Endocrinology*, v.183, p.1-17, 2004.
- TESSIER, C.; DEB, S.; PRIGENT-TESSIER, A. Estrogen receptors a and b in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology*, v.141, p.3842-3851, 2000.
- TORRY, D.S.; HINRICHS, M. e TORRY, R.J. Determinants of placental vascularity. *American Journal of Reproduction Immunology*, v.51, p.257-268, 2004.

- VASUDEVAN, N.; OGAWA, S. e PFAFF, D. Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiology Review*, v.82, p.923-944, 2002.
- VERSLOOT, P.M.; SCHROEDER-VAN DER ELST, J.P.; VAN DER HEIDE, D. et al. Effects of marginal iodine deficiency during pregnancy: iodine uptake by the maternal and fetal thyroid. *The American journal of physiology*, v.273, p.E1121-E1126, 1997.
- VON WOLFF, M.; BOHLMANN, M.K.; FIEDLER, C. et al. Osteopontin is up-regulated in human decidual stromal cells. *Fertility and sterility*, v.81, p.741-748, 2004.
- VONNAHME, K.A.; EVONIUK, J.; JOHNSON, M.L. et al. Placental vascularity and growth factor expression in singleton, twin, and triplet pregnancies in the sheep. *Endocrine*, v.33, p.53-61, 2008.
- VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E. e FORD, S.P. Conceptus competition for uterine space: Different strategies exhibited by the Meishan and Yorkshire pig. *Journal of Animal Science*, v.80, p.1311-1316, 2002.
- VONNAHME, K.A.; WILSON, M.E. e FORD, S.P. Relationship between placental vascular endothelial growth factor expression and placental/endometrial vascularity in the pig. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1821-1825, 2001.
- VONNAHME, K.A.; ZHU, M.J.; BOROWICZ, P.P. et al. Effect of early gestational undernutrition on angiogenic factor expression and vascularity in the bovine placentome. *Journal of Animal Science*, v.85, p.2464-2472, 2007.
- VOSS, A.K.; THOMAS, T. e GRUSS, P. Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*, v.127, p.1-11, 2000.
- VUORELA, P.; CARPEN, O.; TULPPALA, M. et al. VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Molecular human reproduction*, v.6, p.276-282, 2000.
- VUORELA, P.; HATVA, E.; LYMBOUSSAKI, A. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in human placenta. *Biology of reproduction*, v.56, p.489-494, 1997.
- WAKIM, A.N., POLIZOTTO, S.L., BUFFO, M.J. et al. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, v.59, p.1187±1190, 1993.
- WALLACE, J.M.; REGNAULT, T.R.; LIMESAND, S.W. et al. Investigating the causes of low birth weight in contrasting ovine paradigms. *Journal of Physiology*, v.565, p.19-26, 2005.
- WATSON, E.D. e CROSS, J.C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*, v.20, p.180-193, 2005.
- WEBB, R. e ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; Effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, v.53, p.95-112, 1998.
- WEIL, M.; RAFF, M.C. e BRAGA, V.M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Current biology*, v.9, p.361-364, 1999.
- WEITLAUF, H.M. *Biology of implantation*. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. The Physiol. Reprod.. 2. Ed., New York: Raven Press, Ltd., 1994. Cap.7, p.391-440.

- WESTWOOD, F.R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, v. 36, p. 375-384, 2008.
- WHITE, F.J.; BURGHARDT, R.C.; CROY, B.A. et al. Osteopontin is expressed by endometrial macrophages and decidual natural killer cells during mouse pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.73, p.155, 2005.
- WHITLEY, G.S.J. e CARTWRIGHT, J.E. Trophoblast-mediated spiral artery remodeling: a role for apoptosis. *Journal of Anatomy*, 2009.
- WOODING, F.B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta*, v.13, p.101-13, 1992.
- WOODING, F.B.P. e FLINT, A.P.F. Placentation. In "Marshall's Physiology of Reproduction", G. E. Lamming, 4 Ed, Chapman and Hall, New York, p. 233-460, 1994.
- WU, G. e MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, v.336, p.1-17, 1998.
- WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A. et al. Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of nutrition*, v.134, p.2169-2172, 2004.
- YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, v.407, p.242-248, 2000.
- YANG, Z.Z.; TSCHOPP, O.; HEMMINGSMIESZCZAK, M. et al. Protein kinase Ba/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *The Journal of biological chemistry*, v.278, p.32124-32131, 2003.
- YEH, J; KIM, BS; PERISIE, J. Ovarian vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor patterns in reproductive aging. *Fertility and Sterility*, v.89, p.1546-1556, 2008.
- YOTSUMOTO, S.; SHIMADA, T.; CUI, C.Y. et al. Expression of adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the trophoblast giant cells at the embryo implantation site in mouse. *Developmental Biology*, v.203, p.264-275, 1998.
- YOUNG, K.A. e STOUFFER, R.L. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction*, v.70, p.244-252, 2004.
- ZELEZNIK, A.J.; SCHULER, H.M. e REICHERT, L.E. Gonadotropinbinding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle. *Endocrinology*, v.109, p.356-362, 1981.
- ZIMMERMANN, R.C.; HARTMAN, T.; KAVIC, S. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *The Journal of clinical investigation*, v.112, p.659-669, 2003.
- ZOU, K.; YUAN, Z.; YANG, Z. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*, p. 1-6, 2009.

ANEXO 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 129/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Proliferação celular, apoptose, vascularização e expressão da ciclooxigenase-2 e das metaloproteinases e seus inibidores em ovários de ratas com disfunções tireoidianas**", que tem como responsável(is) **Rogéria Serakides**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 08/2009**.

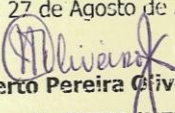
Este certificado expira-se em **26/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 129/2009**, related to the project entitled "**Cell proliferation, apoptosis, vascularization and expression of cyclooxygenase-2 and metalloproteinases and their inhibitors in ovaries of rats with thyroid dysfunction**", under the supervisors of **Rogéria Serakides**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 26, 2009**.

This certificate expires in **August 26, 2014**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3409-4516 – Fax: (31) 3409-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prmg.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 2

PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase

- Xilol 1 (30 min)
- Xilol 2 (30 min)
- Álcool absoluto 1 (5 min)
- Álcool absoluto 2 (5 min)
- Álcool absoluto 3 (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)
- Banho Maria a 98°C (Tampão Citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Bloqueio da peroxidase (30 min) (no escuro – 6 ml de H₂O₂ e completar para 200 ml de metanol – FAZER NA HORA)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Soro bloqueio (30 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- Anticorpo 1º (overnight) – (câmara úmida na geladeira)
- Obs:** A diluição do arquivo está presente no material e métodos.
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Anticorpo 2º (45 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Estreptovidina-peroxidase (30 min)- (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- DAB (1 gota em 1 ml de diluente)]
- Obs.:** O tempo do DAB variou de acordo com o anticorpo primário e está presente no material e métodos.
- Água corrente (10 min)
- Hematoxilina (60 seg)
- Água corrente (10 min)
- Álcool 70% (3 min)
- Álcool 80% (3 min)
- Álcool 90% (3 min)
- Álcool absoluto 3 (10 min)
- Álcool absoluto 2 (10 min)
- Álcool absoluto 1 (10 min)
- Xilol 2 (10 min)
- Xilol 1 (10 min)
- Montagem da lâmina

Preparo dos reagentes:

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

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

ANEXO 3

PROTOCOLO DO TÚNEL

Kit: FragEL DNA Fragmentation Detection Kit – TdT Enzyme (Bateria para 10 laminas e 100 µl/corte)

- Xilol (10 min).
- Xilol (10 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- TBS (5 min)
- Triton-X (10 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Proteinase K (20 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Bloqueio de peroxidase (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TdT Equilibration Buffer (20 min) – temp. ambiente (**Preparar o TdT Labeling Reaction Mixture**)
- TdT Labeling Reaction Mixture (1.5 hs) – **estufa a 37°C**
- TBS (5 min)
- Stop Solution a 37°C (5 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Blocking Buffer (10 min) – temp. ambiente (**Preparar o 1X Conjugate**)
- 1X Conjugate (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente (**Faltando 5 min - preparar o DAB**)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- DAB (15 min).
- Água destilada (10 min)
- Methyl Green (5 - 15 min)
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto novo
- Xilol (15 min) e monte a lamina.

Preparo dos reagentes:

Proteinase K: 10 µl de 2mg/ml de Proteinase K + 990 µl 10 mM Tris

Bloqueio de peroxidase: 200 ml de metanol + 6 ml de peróxido de hidrogênio

TdT Equilibration Buffer: 200 µl de 5X Buffer + 800 µl de dH₂O

TdT Labeling Reaction Mixture: 30 µl TdT Enzyme + 570 µl TdT Labeling Reaction Mix

1X Conjugate: 20 µl 50X Conjugate + 980 µl Blocking Buffer

DAB: 1 tablete de DAB + 1 tablete de H₂O₂/Uréia + 1 ml de água de torneira

TBS: 24,55g de NaCl + 7,27g de Trisma Base + 3 litros de dH₂O (ajustar pH para 7,6)

TRIS: 0,61g de Trisma Base + 500ml de dH₂O (ajustar pH para 8,0)

ANEXO 4



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 239/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Desenvolvimento uterino, placentário e fetal de ratas gestantes com hipotireoidismo**", que tem como responsável(is) **Rogéria Serakides**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 03/2010**.

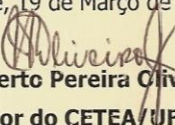
Este certificado expira-se em **10/ 03/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 239/2009**, related to the project entitled "**Uterine, placental and fetal development of pregnant rats with hypothyroidism**", under the supervisors of **Rogéria Serakides**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 10, 2010**.

This certificate expires in **March 10, 2015**.

Belo Horizonte, 19 de Março de 2010.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

(Mod.Cert. v1.0)