

Cíntia Almeida de Souza

Efeito dos hormônios tireoidianos no perfil angiogênico e imune da decídua e glândula metrial de ratas e seu impacto na decidualização, vascularização e população de células uNKs na interface materno-fetal

Tese apresentada à UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração-Patologia Animal, Escola de Veterinária-UFMG, 2017.

Orientadora: Prof. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientadores: Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino e Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2017

S729e Souza, Cíntia Almeida de, 1982-  
Efeito dos hormônios tireoidianos no perfil angiogênico e imune da decídua e glândula metrial de ratas e seu impacto na decidualiação, vascularização e população de células uNKs na interface materno-fetal / Cíntia Almeida de Souza. – 2017.  
186 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides

Co-orientadores: Natália de Melo Ocarino, Alfredo Miranda de Goes

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

Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Glândula metrial – Teses.  
3. Tiroxina – Teses. 4. Hipotireoidismo – Teses. 5. Hormônios tireoidianos – Teses.  
6. Células Killer – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Ocarino, Natália de Melo.  
III. Goes, Alfredo Miranda de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.


CDD – 636.089 607

## FOLHA DE APROVAÇÃO

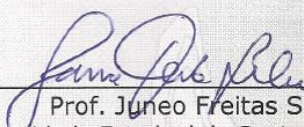
CÍNTIA ALMEIDA DE SOUZA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 14 de Junho de 2017, pela banca constituída pelos membros:



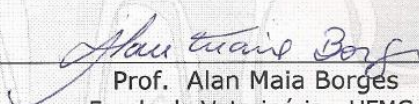
Prof<sup>a</sup>. Rogéria Serakides  
Presidente - Orientador



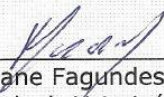
Prof. Juneo Freitas Silva  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof. Guilherme Ribeiro Valle  
Pontifícia Universidade Católica - PUC MINAS



Prof. Alan Maia Borges  
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento  
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Veterinária  
Av. Antônio Carlos, 6627 -  
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970  
Belo Horizonte - Minas Gerais  
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)  
[www.vet.ufmg.br](http://www.vet.ufmg.br)  
E-mail: [cap@vet.ufmg.br](mailto:cap@vet.ufmg.br)



Escola de Veterinária  
UFMG



Ao meu querido filho Arthur Randt Queiroz, o grande amor da minha vida.

Aos meus pais, Tânia e Clério, avós, Luzia e Maria, e tio Gil por todo o carinho, amor, apoio e paciência.



*"Começar de novo é o processo da Natureza, desde a semente singela ao gigante solar"*  
Emmanuel- Chico Xavier





## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, preciosa oportunidade de crescimento e trabalho no bem, que nos concede a cada dia uma página em branco no livro do tempo.

Ao meu amado filho Arthur que é o maior combustível que move minha força de vontade. Que “por você eu dançaria tango no teto, eu limparia os trilhos do metrô, eu iria a pé do Rio a Salvador (BH a Sobral), eu aceitaria a vida como ela é...” (Barão Vermelho). Você que me ensina a cada dia o real significado da palavra AMOR. Nada nem nenhuma conquista profissional se compara a felicidade e a paz que seu sorriso traz ao meu coração.

Aos meus queridos pais, Tânia e Clério, que me propiciaram a vida, me receberam como filha e me possibilitaram a realização deste e de muitos outros trabalhos. Obrigado pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e por abrirem mão de muitas coisas em prol de mim.

Às minhas avós, Luzia e Maria, e tio Gil pelo carinho e amor incondicionais. Pelo exemplo de vida e apoio material e emocional.

Aos meus irmãos Frederico (*in memoriam*) e Paulo, pelo companheirismo mesmo com algumas divergências de pensamento. Ao meu amado afilhado Carlos Henrique que carinhosamente está ao meu lado.

Aos meus queridos amigos do Centro Espírita Manuel Felipe Santiago, CEMFS, por estarem ao meu lado nesta jornada, me ajudando a ser uma pessoa melhor a cada dia, mesmo que em doses homeopáticas devido as limitações pessoais. Contribuíram imensamente para o meu aprimoramento moral, que apenas iniciou.

À Profa. Rogéria Serakides, obrigada por ter acreditado e investido em mim, pela orientação e pelo apoio desde quando eu era aluna de Iniciação Científica até o Doutorado, não só na vida acadêmica como por vezes na vida pessoal. Exemplo profissional de seriedade, caráter, perseverança e dedicação que vou levar para o resto da minha vida. Serei eternamente grata.

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

Ao Prof. Alfredo Miranda de Goes pelo carinho e solicitude ao longo dos anos do doutorado.

Aos meus amigos e irmãos Juneo, Amanda, Lorena, Michelle e Karina que compartilharam alegrias e tristezas comigo ao longo desses últimos anos. Obrigada pela paciência ao me escutarem, desabafando o que está no íntimo. Quantas vezes me fizeram sorrir quando tinha apenas vontade de chorar, mas às vezes a simples presença de vocês trazia de volta o sol a brilhar em minha vida. Michelle esteve junto comigo até mesmo no buraco, literalmente.

Aos meus amigos Sato, Talita e Thais que também estiveram ao meu lado nessa jornada e de quem recebi apoio, otimismo, carinho e lealdade.

À minha amiga Dyeime e sobrinha Marília de coração, pelo carinho, companheirismo e afeto.

Aos amigos, colegas e ex-colegas da Patologia, particularmente Cláudia, Mariana, Carlos, Juliana, Talita, Amanda, Tatiane, Fiuza, Matheus, Camila, Ana Patricia, Luciana, Auricélio, obrigada pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos residentes e ex-residentes do Setor de Patologia, Bruno, Maria, Laís, Vitor, Thais e Pâmela, obrigada por toda a ajuda, amizade e pelo ótimo convívio.

Aos professores do Setor de Patologia, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio e pela profissional que sou hoje.

Às Técnicas do laboratório de Histopatologia, Leimar e Natália, pelo carinho, apoio e companheirismo tanto na vida profissional quanto pessoal, sempre estando dispostas a me ajudar.

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

Aos alunos de Iniciação Científica, Camila, Luciana, Gabriela e Alyson obrigada pela ajuda constante e amizade.

Ao professor Alfredo Goes, obrigada pelas sugestões e pela ajuda para a finalização deste trabalho.

Aos componentes da banca pelas sugestões e comentários finais.

Aos animais que muito me ajudaram no aprendizado e no refinamento do amor e da sensibilidade.

Aos meus amigos das Faculdades INTA, que têm me auxiliado imensamente na finalização do trabalho, com carinho e solicitude.

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

Muito obrigada a todos que contribuíram para minha formação como pessoa e profissional. Serei eternamente e imensamente grata.

*Amemo-nos uns aos outros como Jesus nos amou.*

## SUMÁRIO

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 1. LISTA DE ABREVIACÕES ..... | 13 |
| 2. LISTA DE FIGURAS.....      | 15 |
| 3. LISTA DE TABELAS.....      | 19 |
| 4. RESUMO.....                | 21 |
| 5. ABSTRACT.....              | 23 |
| 6. INTRODUÇÃO.....            | 25 |
| 7. OBJETIVOS.....             | 27 |

### CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

|  |    |
|--|----|
| 1. Interface materno-fetal.....                            | 29 |
| 2. Decidualização.....                                     | 31 |
| 2.1. Implantação do embrião e decidualização.....          | 31 |
| 2.2. Morfologia decidual .....                             | 33 |
| 2.3. Genética e bioquímica da transformação decidual.....  | 35 |
| 2.4. Função das células deciduais.....                     | 41 |
| 3. Invasão de células trofoblásticas na decídua .....      | 44 |
| 4. Invasão de células imunes na Decídua.....               | 46 |
| 4.1. Células uNKs.....                                     | 47 |
| 4.2. Macrófagos.....                                       | 55 |
| 4.3. Células dendríticas (DCs).....                        | 58 |
| 4.4. Células T .....                                       | 61 |
| 4.5. Células B .....                                       | 64 |
| 5. Mudanças vasculares na decídua.....                     | 65 |
| 5.1. Mudança da morfologia vascular .....                  | 65 |
| 5.2. Remodelamento da artéria espiralada.....              | 66 |
| 5.3. Controle da vascularização.....                       | 69 |
| 5.4. Oxigênio .....  | 70 |
| 5.5. VEGF-A .....  | 71 |
| 5.6. PlGF .....  | 72 |
| 5.7. Angiopietinas .....                                   | 73 |
| 5.8. Proteases pericelulares .....                         | 74 |
| 6. Hormônio tireoidiano na reprodução de fêmeas.....       | 75 |
| 6.1. Disfunções tireoidianas .....                         | 75 |
| 6.2. A tireoide e os hormônios tireoidianos.....           | 75 |
| 6.3. Hormônios tireoidianos, seus receptores e ações ..... | 76 |
| 6.4. As disfunções tireoidianas e a gestação .....         | 80 |

### CAPÍTULO 2

#### Os hormônios tireoidianos afetam a decidualização e a angiogênese na decídua e na glândula metrial de ratas

|                  |    |
|------------------|----|
| 1. Resumo.....   | 83 |
| 2. Abstract..... | 83 |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3. Introdução.....</b>  | <b>84</b>  |
| <b>4. Material e Métodos .....</b>                                   | <b>85</b>  |
| 4.1. Manipulação de animais e indução de disfunção tireoidiana ..... | 85         |
| 4.2. Coleta de amostras de sangue e eutanásia .....                  | 86         |
| 4.3. Necropsia.....  | 86         |
| 4.4. Análise histomorfométrica .....                                 | 86         |
| 4.5. Imunoistoquímica.....   | 87         |
| 4.6. Análise estatística.....  | 88         |
| <b>5. Resultados .....</b>   | <b>88</b>  |
| 5.1. Indução da disfunção tireoidiana.....                           | 88         |
| 5.2. Histomorfometria .....  | 89         |
| 5.3. A detecção imunoistoquímica de VEGF, Flk-1 e Tie-2 .....        | 91         |
| <b>6. Discussão .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>7. Conclusão .....</b>  | <b>102</b> |

### CAPÍTULO 3- ARTIGO 2

#### Alteração do perfil de expressão espaço-temporal dos fatores imunológicos da decídua e glândula metrial pelo hipotireoidismo e pelo excesso de tiroxina

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. Resumo .....</b>   | <b>103</b> |
| <b>2. Abstract.....</b>  | <b>104</b> |
| <b>3. Introdução.....</b>  | <b>104</b> |
| <b>4. Materiais e Método .....</b>   | <b>106</b> |
| 4.1. Manejo dos animais e indução das disfunções tireoidianas .....        | 106        |
| 4.2. Coleta de sangue e eutanásia .....                                    | 107        |
| 4.3. Necropsia e colheita de material .....                                | 107        |
| 4.4. Imunoistoquímica.....   | 107        |
| 4.5. RT-PCR Tempo Real .....   | 108        |
| 4.6. Análise Estatística .....   | 109        |
| <b>5. Restultados.....</b>   | <b>109</b> |
| 5.1. Indução das disfunções tireoidianas .....                             | 109        |
| 5.2. Imunoistoquímica.....   | 109        |
| 5.3. Expressão gênica de <i>Ifny</i> e <i>iNos</i> .....                   | 123        |
| <b>6. Discussão .....</b>  | <b>126</b> |
| <b>7. Conclusões.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>   | <b>133</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>   | <b>135</b> |
| <b>ANEXOS</b>  |            |
| <b>ANEXO I- CTEA-UFMG.....</b>   | <b>167</b> |
| <b>ANEXO 2 – Aceite do Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira.....</b> | <b>168</b> |
| <b>ANEXO 3- TABELAS .....</b>  | <b>169</b> |
| <b>ANEXO 4- PROTOCOLO DA ANÁLISE DE IHQ PELO PROGRAMAWCIF.....</b>         | <b>178</b> |
| <b>ANEXO 5- PROTOLOGO DE IHQ .....</b>                                     | <b>182</b> |
| <b>ANEXO 6- EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL COM TRIZOL.....</b>                      | <b>183</b> |
| <b>ANEXO 7- SÍNTESE DE cDNA .....</b>                                      | <b>184</b> |
| <b>ANEXO 8- RT-PCR-TEMPO REAL.....</b>                                     | <b>185</b> |

## 1. LISTA DE ABREVIÇÕES

|  |  |
|--|--|
| Ang-1 - angiopoetina 1   | MIF - fator inibidor da migração de macrófagos                 |
| Ang-2 - angiopoetina 2   | MMP2 - metaloproteinase 2                                      |
| BMP - proteína morfogênica óssea   | MMP9 - metaloproteinase 9                                      |
| cAMP - adenosina monofosfato cíclica                                       | MMPs - metaloproteinases                                       |
| COX-2 - ciclooxigenase 2   | NO - óxido nítrico   |
| CSF-1 - fator estimulatório de colônia 1                                   | P4 - progesterona  |
| DAB - diaminobenzidina   | PGE2 - prostaglandina E2                                       |
| DG - dias de gestação  | PGF2 $\alpha$ - prostaglandina F2 $\alpha$                     |
| DNA - ácido desoxirribonucleico  | PIGF - fator de crescimento placentário                        |
| E2 - Estrógeno   | PLP-A - proteína A semelhante à prolactina                     |
| ECM - matriz extracelular  | PLP-E - proteína E semelhante à prolactina                     |
| EGF - Fator de crescimento epidermal                                       | PLP-F - proteína F semelhante à prolactina                     |
| ER - receptor para estrógeno   | PR - receptor para progesterona                                |
| FGF - fator de crescimento fibroblástico                                   | PRL - prolactina   |
| Fkbp4 (Fkbp 52) - imunofilina  | Pr13b1 - membro 1 da subfamília b da família 3 da prolactina   |
| Flk-1 - receptor 1 de domínio de inserção da quinase                       | PRR - receptores de reconhecimento padrão                      |
| Flt-1 - receptor 1 tirosina quinase semelhante a fms                       | PTG - endoperóxido prostaglandina sintase                      |
| FOXO1 - fator de transcrição forkhead/winged-helix                         | PTU - propiltiouracil  |
| hCG - gonadotrofina coriônica humana                                       | ROS - espécies reativas de oxigênio                            |
| HGF - fator de crescimento de hepatócitos                                  | rT <sub>3</sub> - T <sub>3</sub> reverso                       |
| HOXA10 - Homeobox 10   | RT-PCR - reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa |
| <i>Iarp</i> - proteína responsiva a IFN $\alpha$                           | sFlt-1 - proteína Flt-1 solúvel                                |
| Ifi202b - gene ativador de IFN 202B  | SNK - Student-Neuman-Kells                                     |
| IFN $\gamma$ - interferon gama   | SSP1 - fosfoproteína 1 secretada                               |
| IFN $\tau$ - interferon tau  | T <sub>3</sub> - triiodotironina                               |
| IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina 1                       | T <sub>4</sub> - tiroxina                                      |
| IGFBP1 - proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 1 | TGF $\beta$ - fator de crescimento transformante beta          |
| IL1 - interleucina 1   | TGF $\beta$ 1 - fator de crescimento transformante beta 1      |
| IL10 - interleucina 10   | Th1 - T helper 1   |
| IL15 - interleucina 15   | Th2 - T helper 2   |
| IL1 $\alpha$ - interleucina 1 $\alpha$                                     | Tie-2 - receptor tirosina quinase 2                            |
| IL1 $\beta$ - interleucina 1 $\beta$                                       | TIMPs - inibidores teciduais das metaloproteinases             |
| IL2 - interleucina 2   | TLR - receptor toll-like                                       |
| IL4 - interleucina 4   | TNF $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa                   |
| IL6 - interleucina 6   | TRH - hormônio liberador da tireotropina                       |
| IL8 - interleucina 8   | TSH - hormônio tireoestimulante                                |
| iNOS - óxido nítrico sintetase induzível                                   | uNKs - células <i>Natural Killer</i> uterinas                  |
| <i>Irf 8</i> - fator regulador de IFN                                      | uPA - ativador uroquinase do plasminogênio                     |
| IUGR - restrição de crescimento intrauterino                               | VEGF - fator de crescimento endotelial vascular                |
| LH - hormônio luteinizante   | <i>Wnt</i> - ápteros wingless                                  |
| LIF - fator inibidor de leucemia   |  |
| LPS - lipopolissacarídeo   |  |
| MCP-1 - proteína quimiotática de monócito                                  |  |



---

## 2. LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO 1

|        |  |    |
|--------|--|----|
| Fig. 1 | Desenvolvimento da Decídua de rata. A) Região de decídua mesometrial e anti-mesometrial aos 07 DG em rata, onde F é o feto, T é o trofoblasto invasivo e uNK são as células <i>Natural Killer</i> uterinas. B) Fase pós-implantação aos 10 DG. Diferenciação da decídua mesometrial, da placenta e da glândula metrial. C) 12 DG. Decídua Basal com células decíduais mais diferenciadas, glândula metrial mais desenvolvida com as células uNK se arranjando em padrão concêntrico ao redor dos vasos sanguíneos. D) 14 DG. Decídua basal totalmente diferenciada e redução do seu tamanho, com área de glândula metrial bem desenvolvida. E) 19 DG. Decídua basal menos espessa e glândula metrial com menor número de células uNK e maior número de trofoblastos. (Adaptado de Ain <i>et al.</i> , 2003a e Zhang <i>et al.</i> , 2011)..... | 34 |
|--------|--|----|

### CAPÍTULO 2

|        |  |    |
|--------|--|----|
| Fig. 1 | Fotomicrografia da região de Decídua A) aos 10 DG corado por HE e B) aos 14 DG corado por Tricômio de Masson. Onde: E- embrião; DM- decídua mesometrial; GM- glândula metrial; U- útero; DB- decídua basal.....  | 87 |
| Fig. 2 | A e B. Níveis de T <sub>3</sub> e T <sub>4</sub> livre (média ± DP) no plasma de ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratadas com T <sub>4</sub> no 0 DG e 19 DG (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ )....   | 88 |
| Fig. 3 | (A-1-9) Secções histológicas da interface materno-fetal dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. B) Área de decídua mesometrial dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. Redução da área de decídua no grupo hipotireoide em relação ao controle aos 10 DG e 19 DG. C) Área ocupada por vasos sanguíneos na BD dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. D) Número de vasos sanguíneos na BD dos grupos de controle, hipotireoide e tratados em 10 DG, 14 DG e 19 DG. Aumento do número de vasos sanguíneos no BD do grupo tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo controle aos 10 DG e 19 DG (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ). (Hematoxilina-eosina, Bar = 1000 µm) AD: decídua anti-mesometrial; E: embrião; BD: decídua basal; MG: glândula metrial; MD: decídua mesometrial; P: placenta.....      | 90 |
| Fig. 4 | Detecção de VEGF na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 10 DG com área aumentada e intensidade de imunomarcção de VEGF na região lateral da decídua do grupo hipotireoide em comparação com o grupo de controle; (B) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 14 DG com aumento da intensidade de imunomarcção de VEGF na decídua e glândula metrial no grupo hipotireoide em comparação com o grupo de controle; (C) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 19 DG com redução da área de imunomarcção de VEGF na glândula metrial no grupo hipotireoide em comparação com o grupo controle (* $P < 0,05$ ), estreptavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, 200 µm); (D) Intensidade e área de imunomarcção de VEGF na decídua de ratas 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo..... | 92 |
| Fig. 5 | Detecção de Flk-1 na decídua de ratas do controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 10 DG com aumento na intensidade e área de imunomarcção de Flk-1 na decídua mesometrial na região central no grupo tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo controle; (B) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 14 DG com intensidade de imunomarcção aumentada de Flk-1 na decídua basal e glândula metrial no grupo hipotireoide em comparação ao grupo de controle; (C) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 19 DG com redução na intensidade e área de imunomarcção de Flk-1 na decídua basal e na glândula metrial nos grupos hipotireoide e T <sub>4</sub> em comparação com o grupo controle (* $P < 0,05$ ;   |    |

|        |   |    |
|--------|---|----|
|        | estreptavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, Bar = 200 $\mu$ m); (D) Intensidade de imunomarcção e área de expressão de Flk-1 na decídua de ratas aos 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo.....  | 94 |
| Fig. 6 | Detecção de Tie-2 na decídua de ratas do controle, hipotireoideo e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Detecção imunistoquímica de Tie-2 na decídua aos 10 DG com intensidade de imunomarcção Tie-2 aumentada na região lateral da decídua mesometrial do grupo hipotireoideo em comparação ao grupo de controle; (B) Detecção imunistoquímica de Tie-2 na decídua aos 14 DG não houve alterações significativas entre os grupos; (C) Detecção imunistoquímica de Tie-2 na decídua aos 19 DG com aumento da intensidade e área de imunomarcção Tie-2 na decídua basal e glândula metrial do grupo hipotireoideo em comparação com o grupo controle (* $P < 0,05$ ; estreptavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, Bar = 200 $\mu$ m); (D) Intensidade de imunomarcção e área de expressão de Tie-2 na decídua de ratas aos 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo..... | 96 |

### CAPÍTULO 3

|        |  |              |
|--------|--|--------------|
| Fig. 1 | Detecção imunistoquímica de IFN $\gamma$ na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de IFN $\gamma$ na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua aos 10 DG sem diferença significativa entre os grupos tratado e controle. (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (E) Detecção imunistoquímica de IFN $\gamma$ na decídua basal e glândula metrial aos 19 DG com redução da área de imunomarcção no grupo tratado com T <sub>4</sub> em relação ao controle. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ ).....   | 110 e<br>111 |
| Fig. 2 | Detecção imunistoquímica de IL15 na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de IL15 na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção do grupo tratado com T <sub>4</sub> na região lateral e central e do grupo hipotireoideo na região lateral. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na glândula metrial em ambos os tratamentos e aumento na decídua basal no grupo hipotireoideo, em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de glândula metrial. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção na região de decídua basal nos grupos hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> em relação ao controle. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de IL15 na decídua de ratas aos 07, 10, 12, 14 e 19 DG, são observadas que entre os dias 7 e 10 e 14 e 19 de gestação não houve diferenças significativas entre os períodos em cada grupo. Aos 12 DG houve um pico da imunomarcção para IL15 em relação aos demais períodos analisados. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ )..... | 112 e<br>113 |
| Fig. 3 | Detecção imunistoquímica de iNOS na decídua e glândula metrial de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de iNOS na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoideo em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção na região central do grupo tratado com T <sub>4</sub> . (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal em ambos os tratamentos e na glândula metrial no grupo hipotireoideo, em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de glândula metrial do grupo hipotireoideo. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção na região de glândula metrial no grupo hipotireoideo em relação ao  | 116 e        |



|        |   |              |
|--------|---|--------------|
|        | controle. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ ).....  | 117          |
| Fig. 4 | Detecção imunoistoquímica de MIF na decídua e glândula metrial de ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Decídua aos 07 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção de MIF na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoide e aumento no grupo tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção na região lateral e central dos grupos hipotireoide e tratado com T <sub>4</sub> . (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal no grupo hipotireoide e redução do grupo tratado com T <sub>4</sub> e na glândula metrial houve aumento do grupo tratado com T <sub>4</sub> , em relação ao grupo controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com aumento, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de decídua basal nos grupos hipotireoide e tratado com T <sub>4</sub> e aumento na glândula metrial no grupo hipotireoide, em relação ao grupo controle. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos de tratamento nas áreas avaliadas. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de MIF na decídua de ratas aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ )..... | 118 e<br>119 |
| Fig. 5 | Detecção imunoistoquímica de Lectina DBA na decídua e glândula metrial de ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> . (A) Decídua mesometrial e anti-mesometrial aos 07 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção de Lectina DBA na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoide e tratado com T <sub>4</sub> em comparação com o grupo controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com redução da área e densidade de imunomarcção na região central e glândula metrial dos grupos hipotireoide e tratado com T <sub>4</sub> . (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG com aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal e glândula metrial no grupo tratado com T <sub>4</sub> em relação ao grupo controle. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de decídua basal no grupo hipotireoide, em relação ao grupo controle. (E) Decídua basal e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos de tratamento nas áreas avaliadas. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de Lectina DBA na decídua de ratas aos 07, 10, 12, 14 e 19 DG. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ ).....   | 121 e<br>122 |
| Fig. 6 | Detecção imunoistoquímica (gráfico de linhas) e expressão relativa gênica (gráfico de barras) de IFN $\gamma$ e iNOS na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoide e tratados com T <sub>4</sub> aos 7, 10,12, 14 e 19 DG. (A) Detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$ na decídua e glândula metrial evidenciando pico de expressão aos 12 DG. Expressão relativa de <i>Ifn<math>\gamma</math></i> apresentando redução no grupo hipotireoide aos 10 DG, aumento aos 14 DG e redução em ambos os tratamentos aos 19 DG, em relação ao grupo controle. (B) Detecção imunoistoquímica de iNOS na decídua e glândula metrial evidenciando pico de expressão aos 12 DG. Expressão relativa de iNos apresentando redução no grupo hipotireoide aos 10 DG, aumento do grupo hipotireoide aos 12 DG, redução em ambos os tratamentos aos 14 DG e aumento do grupo hipotireoide aos 19 DG, em relação ao grupo controle. (* $P < 0,05$ ; ** $P < 0,01$ ; *** $P < 0,001$ ) .....  | 124          |



### 3. LISTA DE TABELAS

#### CAPÍTULO 2

|         |   |    |
|---------|---|----|
| Tab. 1. | Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T <sub>4</sub> na expressão de fatores angiogênicos, número de vasos/campo e área de decídua na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle. D- decídua; RL- região lateral; RC- região central; DB- decídua basal; GM- glândula metrial..... | 98 |
|---------|---|----|

#### CAPÍTULO 3

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| Tab. 1. | Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real.....   | 108 |
| Tab. 2. | Concentrações plasmáticas de T <sub>3</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.....  | 109 |
| Tab. 3. | Concentrações plasmáticas de T <sub>4</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.....  | 109 |
| Tab. 4. | Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T <sub>4</sub> na detecção imunoistoquímica de mediadores inflamatórios na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle. D- decídua; RL- região lateral; RC- região central; DB- decídua basal; GM- glândula metrial..... | 125 |
| Tab. 5. | Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T <sub>4</sub> na expressão gênica de mediadores inflamatórios na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle.....   | 125 |

#### ANEXO 3

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| Tab. 1  | Concentrações plasmáticas de T <sub>3</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 DG.....  | 169 |
| Tab. 2  | Concentrações plasmáticas de T <sub>4</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 DG.....  | 169 |
| Tab. 3  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de VEGF em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de VEGF em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....                 | 170 |
| Tab. 4  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de Flk-1 em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de Flk-1 em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....               | 171 |
| Tab. 5  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de Tie-2 em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de Tie-2 em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....               | 172 |
| Tab. 6  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$ em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de IFN $\gamma$ em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação..... | 173 |
| Tab. 7  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de IL15 em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de IL15 em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....                 | 174 |
| Tab. 8  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de iNOS em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de iNOS em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....                 | 175 |
| Tab. 9  | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de MIF em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de MIF em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....                   | 176 |
| Tab. 10 | Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de Lectina DBA em pixels (x10 <sup>5</sup> ) e densidade integrada de Lectina DBA em pixels (x10 <sup>7</sup> ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T <sub>4</sub> ao longo da gestação.....   | 177 |



#### 4. RESUMO

Durante a gestação, a decídua e a glândula metrial coordenam o processo de placentação permitindo a troca seletiva de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto e dão subsídio para a permanência do embrião/feto semi-alogênico em íntimo contato com o útero. Mas, para o sucesso da gestação é fundamental que haja a interação coordenada entre a placenta e o útero comandada por vários hormônios, dentre os quais os hormônios tireoidianos. Foram realizados dois experimentos distintos. O primeiro teve como objetivo avaliar a decidualização e a expressão de fatores angiogênicos na decídua e glândula metrial de ratas com hipotireoidismo e tratadas com L-tiroxina (T<sub>4</sub>) e o segundo objetivou avaliar o perfil de expressão espaço-temporal de fatores imunológicos e as células *Natural Killer* uterinas (uNKs) na decídua e glândula metrial de ratas com hipotireoidismo e tratadas com L-tiroxina (T<sub>4</sub>). Para o primeiro experimento foram utilizadas 72 ratas Wistar adultas distribuídas nos grupos hipotireoideo, tratado com T<sub>4</sub> e controle. Aos 10, 14 e 19 dias de gestação (DG), a decídua e a glândula metrial foram coletadas para avaliação histomorfométrica e imunistoquímica da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Flk-1 e Tie-2. Para o segundo experimento foram utilizadas 108 ratas Wistar adultas, distribuídas em três grupos experimentais, hipotireoideo, tratado com T<sub>4</sub> e controle. As ratas foram eutanasiadas aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG. Avaliou-se a detecção imunistoquímica de IFN $\gamma$ , MIF, IL15, iNOS e a marcação com Lectina DBA para evidenciação das células uNK DBA<sup>+</sup> na decídua e glândula metrial. Além disso, avaliou-se a expressão gênica de *Ifn $\gamma$* , *Il15* e *iNos* por RT-PCR em tempo real. Os dados de ambos os experimentos foram analisados pelo teste *Student-Newman-Keuls* (SNK). No primeiro experimento, evidenciou-se que o hipotireoidismo reduziu a área da decídua aos 10 e 19 DG. Além disso, o VEGF aumentou aos 10 e 14 DG e o Flk-1 apenas aos 14 DG, nos animais hipotireoideos, mas ambos foram reduzidos aos 19 DG na glândula metrial, sem alterar significativamente a área ocupada pelos vasos sanguíneos. As ratas tratadas com T<sub>4</sub> apresentaram aumento do número de vasos sanguíneos decíduais aos 10 e 19 DG. Além disso, aos 10 DG, o excesso de T<sub>4</sub> resultou no aumento de Flk-1 na decídua e na glândula metrial. O hipotireoidismo aumentou o Tie-2 aos 10 e 19 DG na decídua e na glândula metrial. O segundo experimento mostrou que a expressão de fatores pró e anti-inflamatórios estudados oscilou ao longo da gestação em todos os grupos tanto na decídua quanto na glândula metrial. O hipotireoidismo aumentou a expressão proteica de iNOS aos 7 DG, IL15 e MIF aos 10 e 12 dias, IFN $\gamma$  e MIF aos 14 DG na decídua e/ou glândula metrial e dos transcritos gênicos para *iNos* aos 12 e 19 DG e para *Ifn $\gamma$*  e *Il5* aos 14 DG. Além disso, o hipotireoidismo reduziu a expressão proteica dos fatores pró-inflamatórios MIF, aos 7 DG, e IFN $\gamma$ , aos 12 dias, e do transcrito gênico para *Ifn $\gamma$*  aos 10 e 19 DG. O hipotireoidismo também reduziu a expressão proteica do fator anti-inflamatório iNOS aos 12, 14 e 19 DG e reduziu seus transcritos gênicos aos 10 e 14 DG. Os grupos tratados com T<sub>4</sub> apresentaram aumento da expressão proteica de IFN $\gamma$ , IL15 e MIF aos 7 DG, IL15, iNOS e MIF aos 10 DG, MIF aos 12 DG na glândula metrial, IFN $\gamma$  e MIF na decídua basal aos 14 DG. Além disso, o tratamento com T<sub>4</sub> reduziu a expressão proteica de IFN $\gamma$  aos 12 e 19 DG, IL15 aos 12 e 14 DG e iNOS aos 12 e 14 DG. Aos 7 e 10 DG houve a redução da migração de células uNK DBA<sup>+</sup> para a decídua em ambos os grupos de tratamento. Entretanto, aos 12 DG houve aumento no grupo tratado com T<sub>4</sub> e aos 14 DG redução no grupo hipotireoideo. Pode-se concluir com o primeiro experimento, que o hipotireoidismo reduz a área da decídua e aumenta a expressão de VEGF, Tie-2 e Flk-1. O excesso de T<sub>4</sub> promove a angiogênese tecidual ao aumentar o número de vasos na decídua associado ao aumento da expressão de Flk-1. Com o segundo experimento conclui-se que, tanto o hipotireoidismo quanto o tratamento com tiroxina alteram o perfil de expressão espaço-

temporal dos fatores imunológicos da decídua e da glândula metrial ao longo da gestação. A redução dos fatores pró-inflamatórios  $IFN\gamma$  e IL15 é mais predominante no grupo tratado com  $T_4$ , enquanto o hipotireoidismo compromete o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal, uma vez que a redução do fator anti-inflamatório iNOS e das células uNK DBA<sup>+</sup> é principalmente evidenciada neste grupo.

Palavras Chaves: rata, tiroxina, hipotireoidismo, gestação, decídua, glândula metrial

## 5. ABSTRACT

During gestation, the decidua and metrial gland coordinate the placentation process, allowing the selective exchange of nutrients and metabolites between mother and fetus, and provides subsidy for the semi-allogeneic embryo/fetus to remain in close contact with the uterus. But for the success of gestation, it is essential that there is a coordinated interaction between the placenta and the uterus by various hormones, among which thyroid hormones. Two different experiments were performed. The first one was goal to evaluate the decidualization and expression of angiogenic factors and the second one evaluates the spatiotemporal expression profile of immunological factors and the uterine Natural Killer cells (uNKs) in the decidua and metrial gland of rats with hypothyroidism and treated with L-tyroxine (T<sub>4</sub>). For the first experiment, 72 adults Wistar rats were distributed in the hypothyroid, T<sub>4</sub> treated and control groups. At 10, 14 and 19 days of gestation (DG), the decidua and metrial gland were collected for histomorphometric and immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF), Flk-1 and Tie-2 expression. For the second experiment, 108 adults Wistar rats were distributed in three experimental groups, hypothyroid, treated with T<sub>4</sub> and control. The rats were euthanized at 7, 10, 12, 14 and 19 DGs. The immunohistochemical detection of IFN $\gamma$ , MIF, IL15, iNOS and the labeling with Lectin DBA were evaluated for the detection of uNK DBA<sup>+</sup> cells in the decidua and metrial gland. In addition, the expression of *Ifny*, *Il15* and *iNos* by real-time RT-PCR was evaluated. Data from both experiments were analyzed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test. In the first experiment, it was shown that hypothyroidism reduced the decidua area at 10 and 19 DG. In addition, VEGF increased at 10 and 14 DG and Flk-1 only at 14 DGs in the hypothyroid animals, but both were reduced to 19 DGs in the metrial gland, without significantly altering the area occupied by the blood vessels. The rats treated with T<sub>4</sub> showed an increase in the number of deciduous blood vessels at 10 and 19 DG. In addition, at 10 DGs, excess T<sub>4</sub> resulted in the increase of Flk-1 in the decidua and in the metrial gland. Hypothyroidism increased Tie-2 at 10 and 19 DGs in the decidua and metrial gland. The second experiment showed that the expression of pro and anti-inflammatory factors studied oscillated throughout gestation in all groups, both in the decidua and in the metrial gland. Hypothyroidism increased the protein expression of iNOS at 7 DGs, IL15 and MIF at 10 and 12 days, IFN $\gamma$  and MIF at 14 DGs in the decidua and/or metrial gland and the gene transcripts for *iNos* at 12 and 19 DGs and for *Ifny* and *Il5* To 14 DGs. In addition, hypothyroidism reduced the protein expression of the proinflammatory factors MIF, at 7 DG, and IFN $\gamma$  at 12 days, and of the gene transcript for *Ifny* at 10 and 19 DGs. Hypothyroidism also reduced the protein expression of the anti-inflammatory factor iNOS at 12, 14 and 19 DG and reduced its gene transcripts at 10 and 14 DGs. The T<sub>4</sub> treated groups showed increased expression of IFN $\gamma$ , IL15 and MIF at 7 DG, IL15, iNOS and MIF at 10 DG, MIF at 12 DGs in the metrial gland, IFN $\gamma$  and MIF at the baseline decidua at 14 DGs. In addition, treatment with T<sub>4</sub> reduced the protein expression of IFN $\gamma$  at 12 and 19 DG, IL15 at 12 and 14 DG and iNOS at 12 and 14 DGs. At 7 and 10 DG there was a reduction of migration of uNK DBA<sup>+</sup> cells to decidua in both treatment groups. However, at 12 DG there was an increase in the group treated with T<sub>4</sub> and at 14 DG a reduction in the hypothyroid group. It can be concluded from the first experiment that hypothyroidism reduces the decidua area and increases the expression of VEGF, Tie-2 and Flk-1. Excess T<sub>4</sub> promotes tissue angiogenesis by increasing the number of vessels in the decidua associated with increased expression of Flk-1. With the second experiment it was concluded that both hypothyroidism and thyroxine treatment altered the spatiotemporal expression profile of the immunological factors of the decidua and metrial gland throughout pregnancy. The reduction of the proinflammatory factors IFN $\gamma$  and IL15 is more predominant in the group treated with T<sub>4</sub>, whereas hypothyroidism compromises the development of an anti-inflammatory environment at

the feto-maternal interface, since the reduction of the anti-inflammatory factor iNOS and of the uNK DBA<sup>+</sup> cells is mainly evidenced in this group.

Keywords: rat, thyroxine, hypothyroidism, gestation, decidua, metrial gland



## 6. INTRODUÇÃO

Na gestação, o processo de decidualização é fundamental no estabelecimento da interface materno-fetal predominantemente em murinos e primatas humanos e não humanos. Isso porque a decídua coordena o processo de placentação permitindo a troca seletiva de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (Gu *et al.*, 1994a, b; Plaisier, 2011; Cha *et al.*, 2012) e tem um ambiente imunológico singular que permite a permanência do embrião/feto semi-alogênico em íntimo contato com o útero (Gellersen *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2010; Erlebacher, 2013). Portanto, para o sucesso da gestação é fundamental que haja uma interação coordenada entre a placenta e o útero (Collins *et al.*, 2009) que será orquestrada por hormônios, dentre os quais tem-se os hormônios tireoidianos (Poppe *et al.*, 2003; Kilby *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2008; Twig *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Silva e Serakides, 2016).

Durante a decidualização o processo de angiogênese na interface materno-fetal é crítica para o desenvolvimento adequado da placenta e, portanto, do feto (Reynolds *et al.*, 2010). Pela produção de citocinas e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietinas (Ang) e fator de crescimento placentário (PIGF), as células deciduais coordenam a substituição do endotélio vascular das artérias espirais uterinas maternas pelas células do trofoblasto para estabelecer a placenta hemocorial. Durante esse processo, há perda do músculo liso das artérias, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (Ong *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007). Mudanças nesse processo resultam em várias complicações na gestação, como a pré-eclâmpsia, o crescimento intrauterino retardado (IUGR), a morte fetal e o aborto espontâneo (Coulam, 2000; Malassiné *et al.*, 2003; Toder *et al.*, 2003; Redry *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012).

Os fatores responsáveis pela angiogênese são secretados tanto pelas células deciduais quanto pelos leucócitos que infiltram-se na decídua durante a gestação, sendo as células *Natural Killer* uterinas (uNKs) encontradas em maior número. Vários estudos já confirmaram que existe o envolvimento das uNKs no remodelamento vascular, além de influenciarem o perfil imunológico na interface materno-fetal (Moffett-King *et al.*, 2002; Tayade *et al.*, 2005; Hanna *et al.*, 2006; Herington e Bany, 2007; Yang *et al.*, 2008; Lash *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011; Chazara *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Estas células são um tipo de leucócito, com características morfológicas e bioquímicas específicas, que sintetizam uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2003). O recrutamento, a maturação e a diferenciação destas células são dependentes da síntese de interferon gama (IFN $\gamma$ ), da interleucina 15 (IL15) e do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), dentre outros. Essas citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas por vários tipos celulares presentes na decídua, inclusive pelas próprias uNKs e desempenham papel importante na resposta imune inata e adaptativa na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2000; Askar *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

O IFN $\gamma$  estimula a atividade fagocitária de macrófagos e das células gigantes trofoblásticas contra microorganismos (Askar *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2014). A IL15 altera o fenótipo das células NK do interstício uterino e do sangue para o fenótipo das uNKs que estão presentes no endométrio durante a gestação (Kitaya *et al.*, 2003a, b; Keskin *et al.*, 2007; Acar *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013). Além disso, a IL15 aumenta a atividade proliferativa e citolítica das uNKs *in vitro* (Ye *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2000). O MIF estimula a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), IFN $\gamma$ , IL2, IL6 e IL8 (Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Além disso, o MIF estimula a angiogênese e a proliferação celular, enquanto suprime a apoptose (Amin, 2003; Arcuri *et al.*, 2006; Viganò *et al.*, 2007) e reduz a capacidade citolítica das uNKs (Arcuri *et al.*, 2006), antagonizando, portanto, a IL15. Cartwright *et al.* (1999) demonstraram que a motilidade e a invasão das células trofoblásticas na decídua são altamente dependentes da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sintetizada pelos trofoblastos *in vitro*, uma citocina anti-inflamatória.

Ratas com hipo e hipertireoidismo apresentam redução da expressão de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  pelas células trofoblásticas dependendo do período gestacional (Silva *et al.*, 2014), enquanto mulheres com hipotireoidismo tem redução da expressão de IL4 e IL10, citocinas anti-inflamatórias, pelas células decíduais (Twig *et al.*, 2012). É importante ressaltar que alteração na população e na atividade citolítica das células uNKs no endométrio de mulheres gestantes está associada à complicações gestacionais, como aborto e restrição do crescimento intra-uterino (Askar *et al.*, 2003) e é modulada pela IL15 (Ye *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2000). Além disso, camundongos que não possuem células uNKs são férteis, mas exibem remodelamento vascular uterino inadequado, pobre decidualização e baixo peso fetal (Colucci *et al.*, 2011). Pesquisas já demonstraram que o hipertireoidismo materno favorece o ambiente anti-inflamatório placentário em ratas por aumentar a expressão de IL10 e iNOS e reduzir a expressão de TNF $\alpha$  no terço médio da gestação (Silva *et al.*, 2014). O hipotireoidismo, pelo contrário, compromete esse ambiente anti-inflamatório por reduzir a expressão de IL10 e iNOS (Silva *et al.*, 2014). Contudo, ainda não há nenhuma evidência se na decídua de animais com disfunção tireoidiana ocorre o mesmo efeito. O que se sabe é que a síntese *in vitro* de citocinas inflamatórias pelas células decíduais humanas é responsiva à triiodotironina (T<sub>3</sub>) (Vasilopoulou *et al.*, 2014).

O hipotireoidismo materno é conhecido por reduzir o peso ao nascimento e por causar anormalidades placentárias (Silva *et al.*, 2012). Em contraste, o hipertireoidismo promove aumento da taxa de natalidade sem afetar o peso ou a viabilidade fetal (Freitas *et al.*, 2007). Ratas hipotireoideas apresentam a vasculatura do labirinto placentário comprometida e uma expressão trofoblástica reduzida do VEGF e do seu receptor Flk-1 até o final da gestação. Além disso, há redução na expressão de iNOS e migração trofoblástica intrauterina, importantes para a vasodilatação e para a remodelação vascular intrauterina (Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2015) observaram que o hipertireoidismo reduz a expressão de VEGF e Flk-1 em células trofoblásticas ao final da gestação, o que sugere que tais alterações possam estar relacionadas ao parto prematuro exibido por essas ratas (Krammerer *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007; Andraweera *et al.*, 2012). No entanto, as avaliações da decidualização e da expressão de

fatores angiogênicos na decídua e na glândula metrial de animais com disfunção tireoidiana precisam ser caracterizadas, uma vez que a decídua influencia todo o processo de placentação (Galton *et al.*, 1999; Galton *et al.*, 2001).

O uso da rata como modelo para o estudo da interface materno-fetal de primatas humanos e não humanos se deve a várias semelhanças, como a placenta hemocorial e a infiltração profunda de células trofoblásticas na decídua (Enders e Blankenship 1999; Georgiades *et al.*, 2002; Shortman e Liu 2002; Carter e Enders 2004; Carter, 2007; Carter e Mess, 2007; Dilworth e Silbley, 2013; Silva e Serakides, 2016). Contudo, existem algumas diferenças na estrutura, desenvolvimento placentário e alguns tipos de células trofoblásticas entre a placenta humana e da rata (Silva e Serakides, 2016). Durante a placentação, a placenta fetal da rata é organizada em labirinto placentário e zona juncional (camada de espongiotrofoblasto mais camada de células gigantes), diferente da placenta humana organizada em placenta vilosa [citotrofoblasto (interno) e sinciciotrofoblasto trofoblasto (externo) extraviloso (EVT)]. O EVT é semelhante aos trofoblastos invasores de ratas que migram para a decídua (Silva e Serakides, 2016). O volume da decídua e de cada camada da placenta fetal varia de acordo com o período gestacional. Além disso, nos murídeos há aumento dos vasos sanguíneos fetais em que a proporção de espaço sanguíneo materno permanece estável ao longo da gestação (Favaron *et al.*, 2013). A interação entre os vasos sanguíneos fetais e o espaço vascular materno na rata tem uma organização labiríntica. Esta região corresponde às vilosidades placentárias humanas que são cercadas por um espaço intervilloso através do qual flui o sangue materno (Silva e Serakides, 2016). Nesta região, a relação entre as células trofoblásticas e o endotélio dos vasos fetais é hemomonocorial em humanos, enquanto que na placenta de ratas é hemotricorial, isto é, com uma ou três camadas de trofoblasto, respectivamente (Furukawa *et al.*, 2014). Mas, apesar das diferenças, as semelhanças entre a placenta da rata e humana fazem com que a rata seja considerada um excelente modelo animal para o estudo da placentação em humanos (Silva e Serakides, 2016).

## 7. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T<sub>4</sub> na decidualização e na detecção dos fatores angiogênicos VEGF, Flk-1 e Tie-2 pela imunistoquímica na decídua e na glândula metrial a partir do terço médio da gestação em ratas (capítulo 2).

Avaliar os efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T<sub>4</sub> na detecção imunistoquímica das citocinas IFN $\gamma$ , IL15, iNOS, MIF e da lectina DBA para avaliação das células uNK e da expressão de transcritos gênicos para *Ifn $\gamma$* , *Il15*, *iNos* na decídua e glândula metrial ao longo dos terços médio e final da gestação em ratas (capítulo 3).



# CAPÍTULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Interface materno-fetal

A compreensão dos eventos fisiológicos, patológicos e moleculares que ocorrem ao longo da gestação são de fundamental importância, uma vez que os distúrbios reprodutivos acarretam significativos impactos econômicos nos sistemas de produção de alimentos de origem animal. Desta forma, ressalta-se a importância do conhecimento das interações que ocorrem entre mãe e embrião/feto ao longo da gestação para compreensão das patologias que envolvem alteração deste processo. Os murinos são considerados modelos animais importantes para atingir esse objetivo, seja pelo fácil manejo ou pelo ciclo reprodutivo curto. Isso ocorre por apresentarem placenta hemocorial com muita semelhança morfológica com o sítio de inserção placentária humano. Além disso, o conhecimento extraído desse modelo animal ainda serve de base para espécies animais com menor complexidade de interação materno-fetal (Arck e Hecher, 2013; Silva e Serakides, 2016).

A interface materno-fetal é o ambiente onde há contato entre o tecido materno e as células semi-halogênicas do embrião/feto em desenvolvimento. Os tipos celulares que a constituem são células do estroma uterino decidualizado, células inflamatórias e vasculares que constituem a decídua, no lado materno, e o trofoblasto, célula de origem fetal oriunda do ectoderma embrionário, que infiltra-se na decídua e dá origem à placenta. Essa interação é mais intensa nas espécies de placenta hemocorial como é o caso dos murinos, primatas humanos e não humanos. Como resultado dessa interação tão íntima ocorre o processo de decidualização no endométrio pós-ovulação, que caracteriza-se pelo remodelamento vascular e endometrial com transformação das glândulas endometriais e influxo de células *natural killer* uterinas (uNKs) e outros leucócitos (Armant *et al.*, 2000; Imakawa *et al.*, 2004; Arck e Hecher, 2013).

O processo de decidualização é marcado por uma reprogramação morfogenética e bioquímica das células do estroma endometrial. Este processo depende da ação da progesterona via monofosfato de adenosina cíclico que promove mudanças tanto na transcrição gênica quanto na síntese proteica. Como consequência, as células estromais decidualizadas adquirem a capacidade de modular a invasão do trofoblasto, resistir a processos inflamatórios e estresses oxidativos, além de reduzir as respostas imunes maternas contra as células semi-halogênicas do embrião. Nos seres humanos, a decidualização do estroma uterino ocorre no meio da fase luteal do ciclo menstrual, independentemente da gestação (Gellersen *et al.*, 2007).

A reprogramação genética ou fatores epigenéticos das células deciduais é o controle da codificação de DNA e da expressão de todos os genes de cada célula da interface materno-fetal. O controle da expressão dos genes se dá tanto pelo próprio genoma quanto pelo ambiente uterino e do meio extracelular no qual essas células se encontram (Hales e Barker, 1992; Barker e Clark, 1997). Patologias gestacionais têm sido relacionadas à influência do ambiente na regulação epigenética da expressão de genes na interface materno-fetal (Maccani e Marsit,

2009). Ao longo da gestação, para garantir o desenvolvimento, crescimento e a nutrição do feto no útero, é fundamental a formação da placenta (Maccani e Marsit, 2009).

A placenta é um órgão transitório que permite que o feto desenvolva uma íntima relação com o endométrio (Georgiades *et al.*, 2002; Senger, 2003). Em mamíferos, a placenta tem a função de fornecer os nutrientes, eliminar resíduos metabólicos do feto para a corrente sanguínea materna, além de proteger mecanicamente e imunologicamente o feto (Georgiades *et al.*, 2002; Senger, 2003; Maccani e Marsit, 2009). Esta última função se dá pelo fato de o feto ser imunologicamente distinto da mãe e ser considerado semi-allogênico. Além disso, a placenta tem atividade endócrina, por secretar hormônios responsáveis pela manutenção e regulação de várias fases da gestação, e tem atividade metabólica, por promover a metabolização de agentes tóxicos que podem ultrapassar a barreira placentária (Georgiades *et al.*, 2002; Senger, 2003; Maccani e Marsit, 2009).

A implantação do embrião ao endométrio é total somente em murinos, primatas humanos e não humanos, uma vez que o embrião dessas espécies invade efetivamente o endométrio. Entretanto, a terminologia é amplamente utilizada para os demais animais, nos quais a placenta frequentemente se fixa à superfície endometrial (Senger, 2003). Para que a implantação ocorra há uma interação complexa entre vários fatores de crescimento, angiogênicos e hormonais, dentre eles o estrogênio (E2) e a progesterona (P4). Na rata gestante, a ação do E2 já é observada no primeiro dia pós-coito e tem a função de estimular a proliferação das células epiteliais do endométrio. Entretanto, o efeito da P4 se dá somente após a formação do corpo lúteo que ocorre em torno do terceiro dia pós-coito, promovendo a proliferação das células estromais. A ação conjunta desses hormônios promove, até o quarto dia, um ambiente propício para a implantação do blastocisto (Lee *et al.*, 2007).

A interface materno-fetal tem seu início com a chegada do blastocisto ao útero e com a adesão das células trofoblásticas ao epitélio uterino através da expressão de moléculas de adesão, como as L-selectinas e caderinas, em um processo semelhante à adesão leucocitária em vasos sanguíneos em processos inflamatórios (Genbacev *et al.*, 2003; Red-Horse *et al.*, 2004). Esta seria a primeira interação entre células maternas, epitélio uterino, embrião e trofoblastos. Os trofoblastos são células especializadas da placenta que desempenham papel importante na implantação e na formação da interface materno-fetal. Finalizada a implantação e com o estabelecimento da placenta, observa-se que a interação entre mãe e feto se dá pelo desenvolvimento de regiões especializadas, a interface materno-fetal, na qual as células maternas têm contato com as células semi-allogênicas oriundas do blastocisto (Georgiades *et al.*, 2002). Os trofoblastos extravilosos interagem complexamente com vasos sanguíneos maternos, com leucócitos e células deciduais (Red-Horse *et al.*, 2004). Esta peculiaridade gera mudanças morfológicas que resultam na formação de um tecido especializado, a decídua, que visa, além de nutrir e promover o desenvolvimento fetal, a proteção do feto contra o sistema imunológico materno (Georgiades *et al.*, 2002).

A região de decídua é caracterizada morfológica e funcionalmente pela proliferação das células estromais endometriais e sua mudança para células epitelioides volumosas com alta capacidade secretória. Além disso há o aparecimento das uNKs que se proliferam e diferenciam na região

da glândula metrial no triângulo metrial (Correia-da-Silva *et al.*, 2004; Bany e Cross, 2006; Picut *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). Esta célula é uma das principais responsáveis pelo controle da angiogênese e imunologia da região de decídua, eventos estes que propiciam que a placenta venha a exercer suas funções adequadamente.

Portanto, a interface materno-fetal é formada pelo triângulo metrial e pela decídua, que constituem a parte materna, e a placenta que constitui a parte fetal, em murídeos. Qualquer desequilíbrio, seja de ordem genética, fenotípica, metabólica ou infecciosa, em uma dessas partes isoladamente ou que prejudiquem sua interação pode ocasionar perdas embrionárias, restrição do crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia, aborto, natimortalidade, dentre outras patologias gestacionais. Sendo assim, a interação complexa entre essas regiões, bem como dos tipos celulares que as compõe, de forma ordenada e harmônica é fundamental para o sucesso da gestação.

## **2. Decidualização**

### **2.1. Implantação do embrião e decidualização**

A decídua materna tem sua origem na proliferação e metaplasia dos fibroblastos uterinos que se transformam em células volumosas e poligonais, com função endócrina, promovendo um ambiente imunoprivilegiado (Ashkar e Croy, 2001; Adamson *et al.*, 2002; Salamonsen *et al.*, 2003; Picut *et al.*, 2009; Ramathal *et al.*, 2010; Plaisier, 2011; Gellersen e Brosens, 2014). Em murinos, a decidualização endometrial ocorre em resposta à implantação do blastocisto (Ledford *et al.*, 1976; Salamonsen *et al.*, 2003; Blois *et al.*, 2011; Filant e Spencer, 2013). Isso porque existe uma interação íntima entre o trofotoderma do blastocisto e o útero (Malassiné *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009; Plaisier, 2011; Filant e Spencer, 2013; Filant e Spencer, 2014). Entretanto, em humanos, a decidualização ocorre na fase secretória, em resposta ao estímulo do E2 e da P4, independente da presença do blastocisto (Lane *et al.*, 1994; Salamonsen *et al.*, 2003; Ramathal *et al.*, 2010; Plaisier, 2011; Large e DeMayo, 2012). Todo este processo é influenciado pela síntese e interação harmônica entre diversos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e hormônios ovarianos e tireoidianos (Choksi *et al.*, 2003; Malassiné *et al.*, 2003; Bazer *et al.*, 2009; Plaisier, 2011; Filant e Spencer, 2013).

O processo de decidualização pode ser considerado como uma adaptação materna à implantação do embrião (Filant e Spencer, 2013), sendo seguida pela formação da placenta (Teesalu *et al.*, 1996; Balbín *et al.*, 2001; Lindhard *et al.*, 2002; Sharkey e Smith, 2003; Bazer *et al.*, 2009; Blois *et al.*, 2011). A decídua ou placenta materna é importante não somente para ancorar o tecido placentário fetal como também para coordenar direta ou indiretamente todo o remodelamento vascular na interface materno-fetal (Teesalu *et al.*, 1996; Balbín *et al.*, 2001; Lindhard *et al.*, 2002; Bazer *et al.*, 2010; Reynolds *et al.*, 2010). Segundo Orwig e colaboradores (1997), a decídua tem também a função de controlar a invasão trofoblástica, nutrir o embrião em desenvolvimento, além de prevenir a rejeição imunológica do mesmo pela síntese e secreção de citocinas (Bazer *et al.*, 2010; Ramathal *et al.*, 2010; Plaisier, 2011). Quanto mais invasiva a implantação do blastocisto mais extenso é o processo de decidualização,

sendo variável entre as diferentes espécies de animais domésticos, de laboratório e no homem (Senger, 2003; Bazer *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009).

Em espécies com placenta sinepiteliocorial, por exemplo, como é o caso dos ruminantes, a transformação do estroma uterino é moderada uma vez que a interação entre o trofotoderma do embrião com o epitélio uterino é mais superficial. Isso porque existe a interação do trofotoderma embrionário com o epitélio uterino. Neste caso o que se observa é a formação de sincícios, fusão de células do endométrio materno nas regiões de implantação, os cotilédones (Guillomot, 1999; Kennedy *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009; Bazer *et al.*, 2010). Já nos animais com placenta do tipo epiteliocorial, como é o caso dos suínos e equinos, a transformação estromal é discreta por haver o contato, tão somente, entre o trofotoderma do embrião com o epitélio uterino (Guillomot, 1999; Kennedy *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2009; Bazer *et al.*, 2010). Isso ocorre porque nessas espécies o contato entre a célula trofoblástica, semi-halogênica do embrião e o tecido materno é mínimo. Em suínos, por exemplo, as modificações do endométrio são muito sutis (Bazer *et al.*, 2009). O trofotoderma do blastocisto sobrepõe-se ao epitélio endometrial e as células interagem através de moléculas de adesão que se ligam às células adjacentes e/ou à matriz extracelular (ECM) (Guillomot, 1999; Bazer *et al.*, 2009). Em placentas endoteliocorial de carnívoros, ocorre aumento da espessura da membrana basal das células endoteliais que são transpassadas por projeções das células trofoblásticas. Este mecanismo permite que a distância entre a difusão do sangue materno e fetal seja reduzida em carnívoros (Carter e Enders, 2004).

Em murinos, primatas humanos e não humanos, a placenta é do tipo hemocorial, havendo infiltração do blastocisto no endométrio materno, onde mantém contato direto com o estroma (Bazer *et al.*, 2009). A implantação mais invasiva resulta em hiperplasia e hipertrofia dos fibroblastos estromais, com formação de pontes intercelulares, o que lhes confere uma característica epitelióide (Salamonsen *et al.*, 1994; Afonso *et al.*, 1997; Fazleabas *et al.*, 2004; Bany e Cross, 2006; Bazer *et al.*, 2009; Bazer *et al.*, 2010). Essas células alteram seu padrão de expressão gênica e passam a sintetizar e secretar substâncias específicas como prolactina, proteínas da matriz extracelular, fosfoproteína 1 secretada (SPP1), laminina e fibronectina e passam a ser denominadas células decíduais (Bell, 1979; Finn *et al.*, 1989; Christian *et al.*, 2001 b; Fazleabas *et al.*, 2004; Bany e Cross, 2006; Bazer *et al.*, 2009; Plaisier, 2011).

As modificações uterinas durante a decidualização têm início com a aposição do blastocisto ao epitélio uterino e com a comunicação célula-célula (Bazer *et al.*, 2009; Filant e Spencer, 2013; Filant e Spencer, 2014). As integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_4\beta_1$  são expressas no epitélio luminal uterino e no trofotoderma do embrião de camundongos durante a implantação (Sutherland *et al.*, 1993; Thorsteinsdottir *et al.*, 1995; Schultz *et al.* 1997). Essas integrinas interagem com as proteínas da ECM como a fibronectina, fibronectina oncofetal, vitronectina, SSP1, laminina, proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGFBP1), e isoformas do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e são críticas para a implantação invasiva e não invasiva (Fazleabas *et al.*, 2004; Kashiwagi *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009). A interação entre trofotoderma e epitélio luminal uterino, através da adesão focal, promove a reorganização do citoesqueleto de actina e serve como centro de sinalização para as numerosas vias intracelulares



que podem regular a proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular, a expressão gênica e o reparo tecidual (Bazer *et al.*, 2009).

As células decíduais integram um tecido transitório, altamente especializado, que proporciona resistência ao estresse oxidativo e permite a interação das células semi-halogênicas do embrião/feto com o sistema imune materno (Plaisier, 2011). Isso porque há intensa infiltração leucocitária associada ao desenvolvimento da vasculatura local e remodelamento vascular (Fazleabas *et al.*, 2004; Salamonsen *et al.*, 1994; Afonso *et al.*, 1997; Bazer *et al.*, 2009; Bazer *et al.*, 2010).

A decidualização em murinos também pode ocorrer por estímulos exógenos, ou seja, sem a presença do embrião, sendo denominado, neste caso, decíduoma (Kleinfeld *et al.*, 1976; Bell e Searle, 1981; Zheng *et al.*, 1991; Bany e Cross, 2006; Herington e Bany, 2007; Picut *et al.*, 2009). Ratas ovariectomizadas, previamente tratadas com E2 e P4, após receberem doses intrauterinas de substâncias oleosas desencadeiam a diferenciação das células do estroma endometrial em células decíduais (Bell e Searle, 1981; Bany e Cross, 2006; Herington e Bany, 2007). Este tecido diferenciado é muito semelhante a decídua tanto em relação aos tipos celulares que constituem a decídua como no padrão de secreção das células decíduais e dos leucócitos. Entretanto, as células uNKs, por exemplo, têm seu padrão de distribuição e de síntese de citocinas diferente entre a decídua da gestação e o decíduoma (Herington e Bany, 2007). Além disso, no caso do decíduoma, a decidualização ocorre de forma difusa, o que difere da gestação, na qual a diferenciação do endométrio em tecido decidualizado é restrita aos sítios de implantação embrionária (Herington e Bany, 2007; Picut *et al.*, 2009). Kashiwagi e colaboradores (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica da decídua e do decíduoma e observaram que na decídua há maior expressão de genes da família do interferon (IFN), fator regulador de interferon-8 (*Irf-8*), proteína responsiva ao interferon- $\alpha$  (*Iarp*), gene ativador de interferon 202B (*Ifi202b*), *Isg12* e *Isg15*. Além disso, observou-se maior índice mitótico pela marcação de fosfohistona H3 no decíduoma em comparação à decídua (Kashiwagi *et al.*, 2007).

Outros fatores que corroboram com o processo de decidualização são as secreções provenientes das glândulas endometriais, como o fator inibidor de leucemia (LIF). Pela utilização de camundongos *knockout* para glândulas endometriais uterinas, observou-se que esses animais não apresentaram as alterações morfológicas esperadas na decidualização (Filant e Spencer, 2013). Em consequência, nos animais gestantes foi observado defeito na implantação do blastocisto (Filant e Spencer, 2013). Curiosamente, o LIF pode substituir o estímulo nidatório do E2 na indução da implantação embrionária e da decidualização em camundongos (Chen *et al.*, 2000). Contudo, em camundongos *knockout*, sem glândulas endometriais, o LIF não promove a decidualização (Filant e Spencer, 2013).

## **2.2. Morfologia decidual**

A decidualização nos murinos inicia no polo antimesometrial do endométrio, no lado oposto à implantação do blastocisto, dando origem às células decíduais da zona decidual primária (Bell, 1983; Gu *et al.*, 1994a, b; Herington e Bany, 2007; Herington *et al.*, 2009; Picut *et al.*, 2009). Na zona decidual primária, as células decíduais passam a exibir grande quantidade de junções

intercelulares do tipo *tight* e *gap* e grande volume citoplasmático com características epitelioides (Wynn, 1975; Christian *et al.*, 2001a). Por isso, a zona decidual primária é avascular e bem desenvolvida por volta do dia 5,5 de gestação nos camundongos (Herington e Bany, 2007; Herington *et al.*, 2009). Ultraestruturalmente, a diferenciação das células estromais em deciduais é caracterizada pelo arredondamento do núcleo com um aumento do número e complexidade dos nucléolos, expansão e dilatação do retículo endoplasmático rugoso e complexo de golgi, além do acúmulo de glicogênio e lipídios (Finn e Hinchliffe, 1965; Wynn, 1975; Finn e Bredl, 1977; Stewart e Peel, 1980; Cornillie *et al.*, 1985; Christian *et al.*, 2001a; Wang e Dey, 2006). As células deciduais passam, então, a exibir proteínas filamentosas intracitoplasmáticas que incluem microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, constituintes da malha microtubular (Bell e Searle, 1981; Bazer *et al.*, 2010). Duas proteínas do citoesqueleto específicas das células deciduais são a desmina (Oliveira *et al.*, 2000; Bazer *et al.*, 2010) e a actina de músculo liso (Christensen *et al.*, 1995; Bazer *et al.*, 2010). 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).

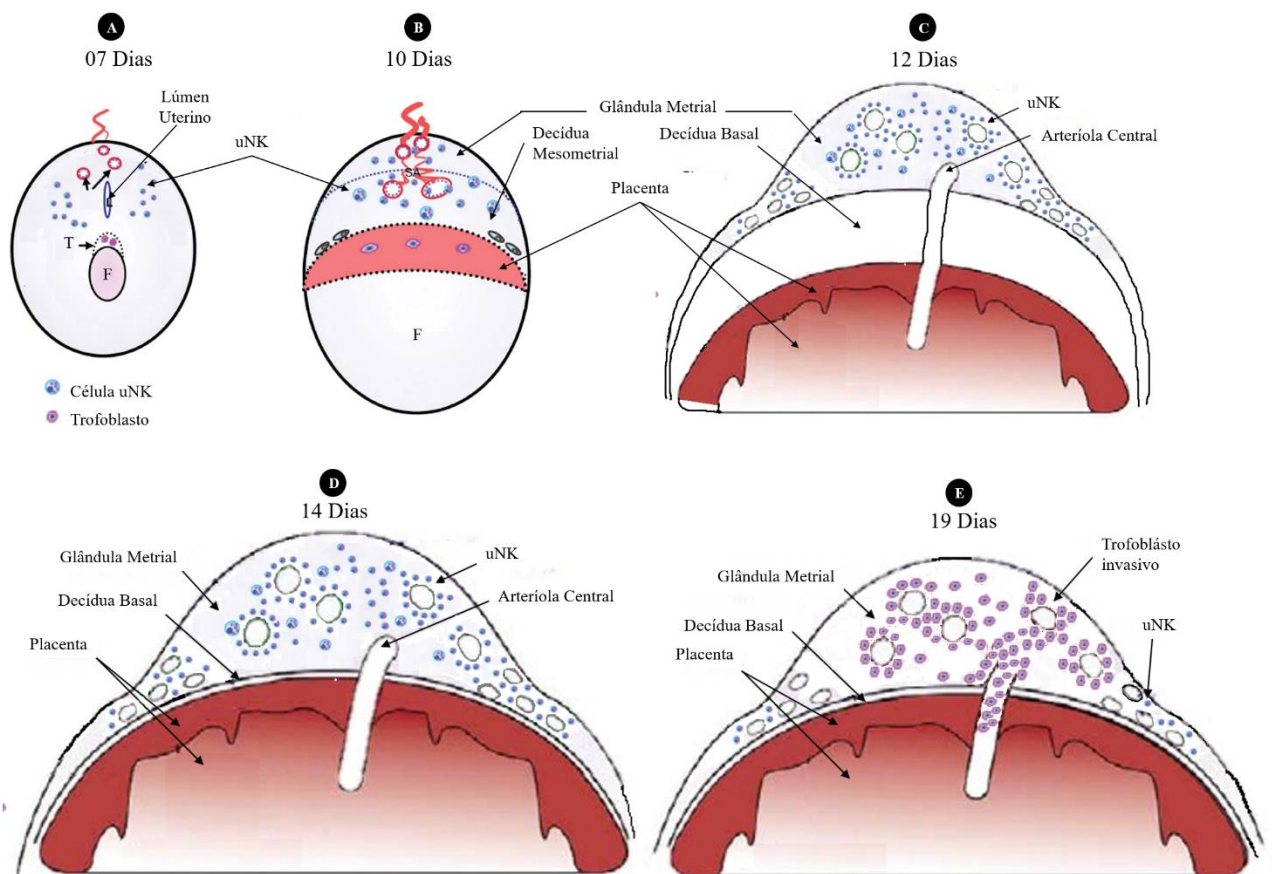


Figura 1. Desenvolvimento da Decídua de rato. A) Região de decídua mesometrial e anti-mesometrial aos 07 DG, onde F é o feto, T é o trofoblasto invasivo e uNK são as células *Natural Killer* uterinas e as setas indicam vasos sanguíneos. B) Fase pós-implantação aos 10 DG. Diferenciação da decídua mesometrial, da placenta e da glândula

metrial. C) 12 DG. Decídua Basal com células decíduais mais diferenciadas, glândula metrial mais desenvolvida com as células uNK se arranjando em padrão concêntrico ao redor dos vasos sanguíneos. D) 14 DG. Decídua basal totalmente diferenciada e redução do seu tamanho, com área de glândula metrial bem desenvolvida. E) 19 DG. Decídua basal menos espessa e glândula metrial com menor número de células uNK e maior número de trofoblastos. (Adaptado de Ain *et al.*, 2003a e Zhang *et al.*, 2011)

Por volta do oitavo dia de gestação, a reação decidual atinge a zona basal do endométrio, adjacente ao miométrio, formando a decídua antimesometrial, que atinge seu desenvolvimento máximo por volta do décimo dia (Fig. 1A). 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 basal (Bell, 1983; Gu *et al.*, 1994a, b; Picut *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). É na região da decídua mesometrial que se identifica a implantação do blastocisto com formação do cone ectoplacentário (Fig. 1B e C). Além disso, neste período, já é possível identificar, na região central ao redor do cone ectoplacentário, algumas células uNKs e células decíduais melhor diferenciadas (Bell, 1983). Esta região é denominada zona compacta, no camundongo ou cone decidual, na rata (Bell, 1983). Enquanto o cone ectoplacentário evolui para dar origem à placenta, a decídua basal muda sua conformação tornando-se uma placa de células decíduais por onde indentificam-se seios venosos bem dilatados. A decídua basal persiste até o final da gestação, mas vai tornando-se cada vez mais adelgada, assumindo um aspecto fibroso após o 16º dia de gestação (Fig. 1D e E) (Bell, 1983; Gu *et al.*, 1994a, b; Picut *et al.*, 2009). Concomitantemente na região do miométrio mesometrial, por volta do 8º ao 10º dia de gestação, há o início do desenvolvimento da glândula metrial marcado pela infiltração de leucócitos e das células uNKs (Bell, 1983; Picut *et al.*, 2009).

No oitavo dia, a glândula metrial é constituída por fibroblastos arranjados frouxamente, células do estroma endometrial alongadas e capilares com endotélio achatado. Aos 12 DG, a glândula metrial continua a aumentar o tamanho. Neste período, as células estromais são mais volumosas e epitelioides, com atividade mitótica moderada e com algumas células bi ou multinucleadas (Fig. 1C). Os capilares encontram-se no início do processo de vasculogênese, angiogênese e remodelamento, sendo revestido por células endoteliais mais volumosas no lúmen (Picut *et al.*, 2009). As células uNKs assumem um padrão de organização angiocêntrico, associadas, por vezes, a macrófagos e a outros leucócitos. Aos 14 dias, já é possível identificar os trofoblastos endovasculares. As células endometriais decidualizadas são ovoides e com finas granulações citoplasmáticas basofílicas e com atividade mitótica e pleomorfismo moderados (Fig. 1D) (Picut *et al.*, 2009). Após o 16º dia de gestação, há infiltração das células de glicogênio na decídua basal e glândula metrial margeando a arteríola central (Picut *et al.*, 2009).

### ***2.3. Genética e bioquímica da transformação decidual***

A decidualização estromal também é regida pela ação dos hormônios esteroides (Salamonsen *et al.*, 2003; Bazer *et al.*, 2009). A receptividade uterina à implantação embrionária requer a ação da P4 e do E2 no útero regulando a síntese local de citocinas, fatores de crescimento, fator de transcrição homeobox e prostaglandinas (Bazer *et al.*, 2009). Essa ação se dá tanto no epitélio do lúmen uterino e glandular, quanto nas células estromais uterinas, estimulando a

decidualização das mesmas. Tanto o E2 quanto a P4 irão atuar nessas células pela ligação aos seus receptores intranucleares ER e PR, respectivamente, induzindo a transcrição de genes alvo (Salamonsen *et al.*, 2003; Bazer *et al.*, 2009; Ramathal *et al.*, 2010). A decidualização endometrial ocorre somente na presença da P4 antecedida pela pré-estimulação pelo E2 (Salamonsen *et al.*, 2003). Essa ação genômica propicia a expressão de uma gama de genes específicos em diferentes tipos celulares do útero (Ramathal *et al.*, 2010). As células do estroma são estimuladas pela P4 e sintetizam fatores de crescimento fibroblástico (FGF) 7 e 10 e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (Bazer *et al.*, 2009). Estes fatores também são expressos em cultivos de fibroblastos endometriais que se diferenciaram em células deciduais pela adição de P4 associada ou não à relaxina (Lane *et al.*, 1994; Salamonsen *et al.*, 2003).

Em murinos, nos dias 1 e 2 de gestação, o estímulo pré-ovulatório de E2 estimula as células epiteliais uterinas a crescer e proliferar. No dia 2,5 já tem início a fase luteal, a qual é caracterizada pela ação da P4 que coíbe a proliferação epitelial e passa a estimular a proliferação das células estromais que, neste momento, ainda é discreta. Essa transição de proliferação epitelial para estromal, regida pelo PR, é de fundamental importância para o sucesso da gestação (Large e DeMayo, 2012). O desenvolvimento de modelos de ratas *knockout* para ER e PR têm firmado a necessidade de suas vias de sinalização para o estabelecimento e sucesso da gestação (Lubahn *et al.*, 1993; Lydon *et al.*, 1995). O camundongo *knockout* para PR tem útero não receptivo e refratário a um estímulo artificial para a decidualização (Lydon *et al.*, 1995). Sendo assim, o útero deste camundongo não pode suportar a implantação embrionária. Quando estes camundongos *knockout* são expostos a estímulos coriônicos de E2 aumenta-se a hiperplasia do epitélio endometrial e uma resposta inflamatória é observada, devido a ação do E2 no útero (Dey *et al.*, 2004). Por outro lado, camundongos ER $\alpha^{-/-}$  apresentam subdesenvolvimento uterino e falha na fixação do blastocisto (Lubahn *et al.*, 1993).

Duas imunofilinas têm sua expressão aumentada durante a implantação do blastocisto, a *Fkbp4* (*Fkbp52*) e a *Fkbp5* (*Fkbp51*), sendo associadas a expressão de receptores de P4. Sua importância no início da gestação foi determinada pela realização de estudos com camundongos *knockout* para *Fkbp4*. Esses camundongos mostraram-se inférteis por redução da transcrição de genes alvo pela P4 e, conseqüentemente, falha na implantação e decidualização. Isso ocorre porque a ausência das imunofilinas leva à redução intensa da atividade transcricional do PR e, conseqüentemente, reduz a expressão de muitos genes alvo, incluindo o Homeobox A-10 (*Hoxa 10*), Indian Hedgehog (*Ihh*) e o Anfiregulim (*Areg*) (Large e DeMayo, 2012).

O HOXA10 é um membro da família homeobox (HOX). Os genes HOX estão envolvidos no controle genético do desenvolvimento, principalmente do feto, na orientação espacial das células em multiplicação, determinando o direcionamento celular e vários outros processos de desenvolvimento básico (Kim e Fazleabas, 2004). Por este motivo o HOXA10 é que tem a capacidade de estimular a expressão da integrina  $\beta 3$ , implicada na migração e aderência celular, além dos receptores de P4 (Kim e Fazleabas, 2004). Estudos revelaram que ocorre a expressão do HOXA10 também no endométrio, sendo aumentada no sítio de implantação do blastocisto. Camundongos *knockout* para HOXA10 apresentam a decidualização endometrial comprometida, mesmo quando estimulada artificialmente, tornando impossível a gestação

(Benson *et al.*, 1996; Kim e Fazleabas, 2004). O papel do gene HOX na regulação do IGFBP-1 já foi demonstrado em estudos com camundongos *knockout* para HOXA5. Esses camundongos expressam 12 vezes mais a IGFBP-1 no fígado e apresentam redução em torno de 50% da síntese de IGF-1.

O FOXO1 é um membro da família dos fatores de transcrição *forkhead/winged-helix* implicados na diferenciação e na proliferação celular (Kim *et al.*, 2003; Ramathal *et al.*, 2010). O FOXO1 é expresso no endométrio de babuínos e também tem sua expressão aumentada na fase luteal do ciclo menstrual em mulheres (Kim e Fazleabas, 2004). O FOXO1 está ligado a transcrição nuclear e causa repressão ou transcrição de genes. Por este fato, o FOXO1 pode interagir com receptores nucleares para estrógeno, ácido retinoico e hormônios tireoidianos (Kim e Fazleabas, 2004). O FOXO1 pode também associar-se ao CCAAT/proteína ligadora potencializadora beta (C/EBP- $\beta$ ) aumentando a síntese decidual de PRL em resposta a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) (Kim e Fazleabas, 2004; Ramathal *et al.*, 2010). Além disso, camundongos *knockout* para o *Foxa2* tem útero com número reduzido de glândulas endometriais e comprometimento da implantação do blastocisto, mesmo diante da tentativa de indução artificial da decidualização endometrial (Jeong *et al.*, 2010). Este fato impossibilita o endométrio de dar sustentação à gestação, em parte por redução da síntese do LIF pelas células epiteliais das glândulas endometriais (Jeong *et al.*, 2010).

Devido aos hormônios esteroides, fatores de crescimento e fatores parácrinos liberados pelo blastocisto, os fibroblastos do estroma endometrial iniciam o processo de decidualização e sofrem uma reprogramação que visa a expressão de genes diferenciados e específicos para que o processo ocorra adequadamente (Brar *et al.*, 2001; Ain *et al.*, 2003a, b). Essa reprogramação altera o padrão dessas células, para células com alta capacidade secretória. Ensaio *in vitro* possibilitam o entendimento da reprogramação das funções das células, incluindo repressão de receptores para hormônios esteroides, alteração do metabolismo, remodelamento da ECM e do citoesqueleto. Além disso, a mudança na conformação da expressão gênica resulta em alteração da expressão das enzimas intracelulares, fatores de crescimento, citocinas e seus receptores, além da indução de moduladores da apoptose e fatores de transcrição deciduais específicos (Popovici *et al.*, 2000; Brar *et al.*, 2001; Christian *et al.*, 2001a). A iniciação da resposta decidual requer uma elevada concentração intracelular de cAMP, um segundo mensageiro importante para as reações intracelulares (Christian *et al.*, 2001a, b). A prostaglandina E2 (PGE2), relaxina, fator liberador de corticotropina, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) ligam-se aos seus receptores específicos na superfície celular das células do estroma endometrial e ativam as proteínas G acopladas (Brar *et al.*, 1997; Christian *et al.*, 2001b; Ferrari *et al.*, 1995; Moy *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1993; Telgmann e Gellersen, 1998). A proteína G ativada pode tanto estimular como inibir sinalizações intracelulares. As proteínas G ativam as enzimas catalíticas como a adenilato-ciclase e fosfolipase C, responsável pela geração dos segundos mensageiros cAMP e diacilglicerol, respectivamente (Meyer e Habener, 1993; Christian *et al.*, 2001a, b).

Outra substância com importante envolvimento na decidualização endometrial e na implantação embrionária é a prostaglandina (PG) (Tobert, 1976; Biggers *et al.*, 1981; Kennedy *et al.*, 2007).

A prostaglandina é oriunda da ação da endoperóxido prostaglandina sintase (PTG) sobre o ácido aracdônico dando origem a PGH<sub>2</sub> e esta, por sua vez, sobre a ação da fosfolipase A<sub>2</sub> dá origem as PGs ativas (Kennedy *et al.*, 2007). Por isso, a PG encontra-se presente em vários locais no organismo dos mamíferos, inclusive no útero gravídico. Em éguas, por exemplo, a PGE<sub>2</sub>, secretada pelo embrião, é fundamental para que o embrião entre no útero (Bazer *et al.*, 2009). O mecanismo de reconhecimento materno em ruminantes se dá pela ação antiluteolítica do interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ), impedindo a liberação de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  pelo útero, que, quando liberada, causa a regressão do corpo lúteo (Soares, 2004; Bazer *et al.*, 2009). Em suínos, o E2 sintetizado pelo blastocisto, atuando em conjunto com o ER, exerce efeito antiluteolítico no epitélio endometrial. Isso porque há impedimento da liberação endócrina da PGF<sub>2</sub> $\alpha$  por redirecionar a sua secreção para o lúmen uterino onde é metabolizada em PGE<sub>2</sub> (Bazer *et al.*, 2009).

A ação das PGs em roedores durante a implantação foi evidenciada quando constatou-se que havia aumento da quantidade de PGE nos sítios de implantação embrionária em hamsters (Evans e Kennedy, 1978). Este aumento de PGE resultou em aumento da permeabilidade vascular no sítio de implantação (Evans e Kennedy, 1978; Kennedy e Zamecnik, 1978). Além disso, a administração intrauterina de antagonistas da PGE<sub>2</sub> nos hamsters resultou em mortalidade fetal e reduziu o número de sítios de implantação aos cinco dias de gestação (Evans e Kennedy, 1978). Em camundongos, a administração de antagonistas da PGE intrauterina, no momento próximo à implantação, também reduziu o número dos sítios de implantação (Biggers *et al.*, 1981). Outro fato interessante é que camundongos *knockout* para o gene *Ptgs2*, ou seja, COX-2<sup>-/-</sup>, que é essencial para a síntese de PGs, tiveram problemas reprodutivos, incluindo falha na implantação do blastocisto e da decidualização (Lim *et al.*, 1997). Entretanto, em outro experimento utilizando camundongos *knockout* para o gene *Ptgs2* realizado por Cheng e Stewart (2003) foi observado, tão somente, o atraso no processo de decidualização, em torno de 24 horas, não havendo comprometimento da gestação. Uma explicação para este fato pode ser a linhagem distinta de camundongos e a não atenuação adequada do gene (Cheng e Stewart, 2003). Contudo o papel das PGs no processo de decidualização e gestação em murinos ainda precisa ser adequadamente investigado, bem como sua associação com patologias gestacionais (Kennedy *et al.*, 2007).

A interleucina 11 (IL11) também é expressa no sítio de implantação embrionária (Ramathal *et al.*, 2010), sendo sintetizada pelo endométrio na fase secretória em humanos (Salamonsen *et al.*, 2003). A IL11 é responsável por uma variedade de funções celulares, mas o seu papel na região de decídua tem sido relacionado com a proliferação e diferenciação das células estromais em células deciduais. Isso se deve ao fato de que a utilização de antagonistas com sua consequente inibição impede a proliferação e a diferenciação das células estromais tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Menkhorst *et al.*, 2009). Acredita-se que a IL11 controle a expansão mitótica das células endometriais humanas no início da fase secretória (Karpovich *et al.*, 2003).

As proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento multifuncionais e, tanto elas quanto os ápteros *wingless* (Wnt), pertencem a grande família do TGF $\beta$  que modulam o crescimento tecidual, inclusive na decídua (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Ramathal *et al.*, 2010). Na decídua, em células deciduais e endoteliais, foram encontradas as BMPs (Ying e

Zhao, 2000) e o *Wnt4* (Franco *et al.*, 2011). Através de hibridização *in situ* foi identificado em região de decídua mesometrial de camundongos, aos 4,5 DG, RNAm de *Bmp7* nas células estromais em decidualização ao redor do blastocisto e próximo ao epitélio uterino (Ying e Zhao, 2000). Além disso, a partir do dia 5,5 de gestação, foi encontrado RNAm de *Bmp8* na decídua antimesometrial e *Bmp2*, *Bmp4* e *Smad1* na decídua mesometrial (Ying e Zhao, 2000). Neste período, a *Bmp2* predominou nas células deciduais enquanto que a *Bmp4* e *Smad1* predominou nas células endoteliais (Ying e Zhao, 2000). Detectou-se também que a ação dos hormônios esteroides na decídua, tanto mesometrial quanto antimesometrial, no início da gestação foi dependente da sinalização do Bmp2 (Ying e Zhao, 2000). Tanto as BMPs quanto o Wnt têm uma ampla gama de funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, migração e adesão em vários tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário (Hogan, 1996; Ying e Zhao, 2000; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2007). Essas funções essenciais foram evidenciadas quando camundongos *knockout* para *Wnt4* ficaram gestantes e apresentaram subfertilidade devido a defeitos na implantação por apresentarem menor número de glândulas uterinas. Em consequência, houve redução da sobrevivência das células do estroma endometrial e da diferenciação e responsividade aos receptores de P4. Além disso, muitos desses animais apresentaram metaplasia escamosa do epitélio glandular e endometrial uterino, corroborando com a subfertilidade (Franco *et al.*, 2011). Este fato fica mais evidente quando se realiza a administração de antiprogesterina, em culturas de células endometriais de camundongos em decidualização, resultando em redução da expressão de *Bmp2* nas células do estroma uterino (Li *et al.*, 2007). Contudo, quando se adicionou *Bmp2* ao meio de cultura aumentou a expressão de *Wnt4* e estimulou o processo de diferenciação das células estromais em células deciduais (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). *Microarrays* de animais *Bmp2 knockout* tiveram mudanças gênicas específicas, incluindo a ausência de sinalização da via *Wnt*, reduzida expressão de receptores de P4 e a indução de PG2 sintase (*Ptgs2*) (Lee *et al.*, 2007).

Um outro fator que corrobora com a decidualização uterina é o inibidor de serina peptidase tipo Kazal 3 (SPINK3). O SPINK3 é uma proteína que tem a função de fator de crescimento induzindo a proliferação de vários tipos celulares durante o início da embriogênese (Chen *et al.*, 2010). O RNAm é expresso no útero da rata somente no epitélio glandular, entretanto a proteína SPINK3 foi detectada no epitélio luminal e em células deciduais agindo como fator parácrino associado ao processo de decidualização, independente da presença do blastocisto (Chen *et al.*, 2010). Além disso, fatores secretados pelo epitélio luminal sob estímulo do LIF agem estimulando a decidualização das células estromais (Filant e Spencer, 2014). Outras várias substâncias sintetizadas no endométrio como citocinas, fatores de crescimento, IL11, relaxina, ativina A, hormônio liberador de corticotropina (CRH), e LIF também agem potencializando a decidualização das células estromais em murinos e humanos, sendo sua secreção induzida pela P4 *in vitro* (Dimitriadis *et al.*, 2005; Filant e Spencer, 2014).

Os receptores *Toll-like* (TLRs) são amplamente expressos pelas células na interface materno-fetal (Koga *et al.*, 2009; Koga e Mor, 2010). Estas moléculas são proteínas transmembrana, parte do sistema imune inato, que permitem o reconhecimento de moléculas da superfície de patógenos. O TLR2 reconhece lipoproteínas bacterianas, peptídeo-glicanos e ácido lipoteicoico, enquanto que o TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas e

quando as células são estimuladas tendem a sintetizar IL6 e IL8 (Abrahams *et al.*, 2004; Koga *et al.*, 2009). Entretanto, na interface materno-fetal, os TLRs não são expressos somente pelas células imunes, mas também pelas células decíduais e trofoblastos (Koga *et al.*, 2009; Koga e Mor, 2010). As células trofoblásticas expressam apenas TLR2 e TLR4. Avaliando-se culturas de células trofoblásticas do primeiro trimestre de gestação em humanos pode-se observar que o TLR2 esteve ligado a apoptose celular devido a inativação do inibidor de apoptose e ativação das caspases 8, 9 e 3. Enquanto isso, o TLR4 estimulou a síntese de citocinas pelas células trofoblásticas (Abrahams *et al.*, 2004). Em outro ensaio, foi possível constatar que quando o TLR3 e TLR4 foram estimulados pela ligação com partículas virais e LPS bacterianos, respectivamente, as células trofoblásticas promoveram aumento considerável da quimiotaxia para macrófagos e neutrófilos (Abrahams *et al.*, 2005). Além das células trofoblásticas, as células uNKs do triângulo metrial também expressaram os TLRs. Foi demonstrado que a hiperestimulação do receptor TLR3 por um agonista, em ratas no dia 6,5 de gestação, promoveu, 24 horas após, o aumento da secreção de IFN $\gamma$  e de TNF $\alpha$  pelas uNKs (Zhang *et al.*, 2007). Nas células decíduais de mulheres ao final da gestação, por imunistoquímica e PCR, foram detectados os TLR1, 2, 4, e 6 (Canavan e Simhan, 2007). Foi observado, também, que esses TLRs respondiam ao estímulo de LPS e peptidoglicanos pela síntese de IL8, conferindo-lhes a participação no sistema imune inato (Canavan e Simhan, 2007).

Com o desenvolvimento das células decíduais, elas passam a exibir junções intercelulares semelhantes à das células epiteliais, por isso, inclusive, assumem um arranjo epiteloide. Neste caso, as células decíduais passam a expressar proteínas como a conexina 43 (Cx43), que são uma das maiores proteínas presentes nas junções tipo *gap* (Laws *et al.*, 2008). As conexinas são proteínas que formam canais transmembrana através dos quais a comunicação intercelular ocorre (Ramathal *et al.*, 2010). O aparecimento da Cx43, em murinos, durante a decidualização estromal é acompanhado por remodelamento da matriz extracelular, bem como do processo de vasculogênese e angiogênese, necessários pela maior demanda metabólica das células, que assumem características secretórias, e do embrião implantado (Carson *et al.*, 2000). Por isso, investigando-se o papel da Cx43 durante a decidualização observou-se que essa proteína exerce grande influência na comunicação entre as células decíduais e vasos sanguíneos (Laws *et al.*, 2008). Neste estudo, também foi possível perceber que em camundongos gestantes, a expressão de Cx43 é regulada pelo E2 nas células do estroma uterino em transformação. Pela utilização de camundongos *knockout* para Cx43, sob estímulo deciduogênico, há redução da diferenciação estromal, bem como da vascularização decidual (Laws *et al.*, 2008). Isso porque houve redução da proliferação de células endoteliais e alterações dos fatores angiogênicos, tais como o VEGF e a Ang-2 e -4. Sendo assim, pode-se inferir que a falta de Cx43 altera as secreções parácrinas das células decíduais resultando em redução da migração de células endoteliais e, conseqüentemente, redução da formação de vasos na decídua (Laws *et al.*, 2008). Isso ocorre porque no epitélio endometrial e glandular, as células decíduais e/ou o embrião modulam a síntese de inúmeras substâncias com efeito parácrino, aprimorando a indução da decidualização das células estromais (Dimitriadis *et al.*, 2005; Bany e Cross, 2006; Kashiwagi *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2012), de modo que alterações nesse equilíbrio resultariam em decidualização insuficiente para suportar uma gestação.



#### 2.4. Função das células decíduais

A decídua, que se constitui num tecido diferenciado que surge no início da gestação e regride a partir do terço médio da gestação, possui diversas funções (Bell, 1983; Orwig *et al.*, 1997). Dentre estas funções, pode-se citar a coordenação do desenvolvimento placentário, a vasculogênese, a angiogênese e o remodelamento vascular na interface materno-fetal (Reynolds *et al.*, 2010). Segundo Orwig e colaboradores (1997), a decídua tem também a função de controlar a invasão trofoblástica, nutrir o embrião em desenvolvimento, além de prevenir a rejeição imunológica do mesmo, pela síntese e secreção de citocinas (Orwig *et al.*, 1997; Ramathal *et al.*, 2010; Plaisier, 2011). Vale ressaltar também que as células decíduais promovem um ambiente uterino resistente ao estresse oxidativo, que é primordial para o desenvolvimento feto-placentário adequado (Adelman *et al.*, 2000; Red-Horse *et al.*, 2004; Plaisier, 2011).

O controle da invasão de células trofoblásticas pelas células decíduais tem o objetivo de evitar a demasiada expoliação materna por parte do feto durante a gestação (Orwig *et al.*, 1997; Afonso *et al.*, 2002; Ramathal *et al.*, 2010; Matjila *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2016). Este controle se dá pelo equilíbrio entre as proteinases secretadas pelo trofoblasto e inibidores de proteinases secretados pelas células decíduais (Afonso *et al.*, 1997, 1999, 2002). As células trofoblásticas secretam catépsina lisossomal, catépsina proteinase ácida B e D, metaloproteinases (MMPs) e ativador uroquinase do plasminogênio (uPA) com a finalidade de degradar a ECM da decídua e permitir a invasão trofoblástica (Afonso *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2016). A inibição da invasão se dá pela síntese de inibidores dessas enzimas sintetizados predominantemente pelas células decíduais (Xu *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2016). Na decídua também existem elevadas quantidades de fatores pró-invasivos secretados pelos leucócitos decíduais, que incluem IL1 $\beta$ , IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL13, IL15, Eotaxina CCL11, IP10 e RANTES, e fatores anti-invasivos IL10, IL12 e VEGF (Sharma *et al.*, 2016).

As MMPs, sintetizadas pelo trofoblasto (Xu *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2011) e células decíduais (Fontana *et al.*, 2012), são uma das principais enzimas que degradam a matriz extracelular. Contudo, a síntese de inibidores das MMPs (TIMPs) pelas células decíduais, predominantemente, e células trofoblásticas reduzem intensamente o potencial invasivo do trofoblasto (Xu *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2012), sendo o equilíbrio entre as MMPs e as TIMPs fundamental para o sucesso da gestação. Aos 10 DG, em camundongos, a decídua expressa MMP2 e 9, tendo sido mais intensa nas uNKs próximas aos vasos sanguíneos. Este fato demonstra a ação das MMPs não só facilitando a migração dos trofoblastos extravilosos, permitindo sua chegada aos vasos sanguíneos, como também no remodelamento vascular, permitindo, assim, a entrada dos trofoblastos endovasculares (Fontana *et al.*, 2012). Em ratas, a MMP2 tem seu pico de expressão no terceiro dia pós-coito enquanto que a MMP9 é expressa a partir do dia nove de gestação (Rechtman *et al.*, 1999).

As TIMPs são expressas na decídua da mulher no terço inicial da gestação por células decíduais, predominantemente, e por trofoblastos extravilosos, em menor proporção. As TIMPs foram detectadas também na ECM ao redor das células trofoblásticas e decíduais e na membrana basal que separa as células trofoblásticas da decídua (Huppertz *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000; Luo *et*

*al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2012). Ao final da gestação, as células trofoblásticas extravilosas apresentam maior expressão de TIMP1 do que placentas do terço inicial da gestação (Huppertz *et al.*, 1998). O conjunto desses achados nos permite inferir que não somente as células decíduas promovem o controle da migração das células trofoblásticas como existe também uma autoregulação.

Outro inibidor da ação enzimática é a cistatina C, sintetizada pelas células decíduas. A cistatina C é um inibidor de catipsina B e L de origem trofoblástica. As catipsinas B e L degradam a ECM e também auxiliam no remodelamento vascular na região da decídua. A cistatina C tem localização perinuclear em vesículas citoplasmáticas. Em cultivo de células decíduas de camundongos, em meio contendo TGF $\beta$ <sub>1</sub> e fator de crescimento epidermal (EGF), há aumento da densidade celular e de cistatina C que aumenta consideravelmente em relação às células cultivadas sem esses fatores. Este fato possibilita inferir que indiretamente o TGF $\beta$ <sub>1</sub> e o EGF atuam limitando a invasão trofoblástica (Afonso *et al.*, 2002).

Uma outra função da decídua é a nutrição do embrião em desenvolvimento por meio da nutrição histiotrófica. Em ruminantes, suínos e equinos a nutrição histiotrófica ocorre ao longo de toda a gestação e se dá, principalmente, por secreções das células epiteliais do endométrio e das glândulas endometriais. Nas espécies de placenta hemocorial, como é o caso dos murinos, primatas humanos e não humanos, a nutrição histiotrófica ocorre predominantemente no início da gestação até o estabelecimento da placenta quando a nutrição passa a ser hemotrófica (Aplin e Kimber, 2004; Soares, 2004). As glândulas endometriais secretam glicogênio e outras substâncias nos espaços intervilosos com a finalidade de nutrir o embrião até a 10ª semana de gestação em humanos (Burton *et al.*, 2002). Além disso, as células decíduas também sintetizam e secretam proteínas para a nutrição do blastocisto quando este penetra o endométrio (Bell *et al.*, 1985). Os trofoblastos são nutridos por fagocitarem mucina 1 (MUC-1) e glicodelin A (Burton *et al.*, 2002). Ovelhas que têm redução ou falta de glândulas endometriais têm o desenvolvimento embrionário até a fase de eclosão do blastocisto, contudo este não se fixa ao endométrio. Este fato é um forte indício de que a nutrição histiotrófica é fundamental para a implantação do embrião em ovinos (Gray *et al.*, 2002; Aplin e Kimber, 2004). Camundongos *knockout* para glândulas endometriais ciclam, contudo são inférteis (Filant e Spencer, 2013). Foi observada a presença do blastocisto no útero desses animais entre os dias 5,5 e 8,5 pós-coito. Entretanto, não foram observadas reações típicas do processo de implantação nem reação decidual das células do estroma endometrial (Filant e Spencer, 2013). Estes achados respaldam ainda mais a importância das substâncias secretadas pelas glândulas endometriais na nutrição histiotrófica do embrião e no processo de decidualização.

A função da decídua de coordenar o desenvolvimento placentário, bem como a vasculogênese e a angiogênese na interface materno-fetal, se dá principalmente pelo controle da proliferação e da apoptose das células decíduas, trofoblásticas e vasculares. A proliferação celular é estimulada pela síntese de fatores de crescimento, por suas proteínas ligadoras e receptores e substâncias antiapoptóticas produzidas pelas células decíduas. As células decíduas tornam-se fenotipicamente distintas dos fibroblastos, seus precursores, pelo processo de reprogramação genética, o que permite que elas apresentem um perfil proteico diferenciado (Brar *et al.*, 2001;

Ain *et al.*, 2003b; Salamonsen *et al.*, 2003). Dentre as proteínas secretadas pelas células decíduais que coordenam direta ou indiretamente esse processo, tem-se os fatores de crescimento sintetizados pelas células decíduais os IGFs e suas proteínas ligadoras e receptores (Lane *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2007), EGF (Hom *et al.*, 1998; Sai e Ogle, 1999; Afonso *et al.*, 2002), FGF (Hess *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009), PlGF, VEGF, angiopoietinas, HGF (Bazer *et al.*, 2009) e fatores de crescimento da família do TGF $\beta$  (Afonso *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2007). Esses fatores de crescimento têm a função de promover a proliferação, diferenciação e o remodelamento celular de forma autócrina e parácrina na interface materno-fetal (Zhao *et al.*, 2016). Além disso, as células decíduais secretam também PRL, relaxina, desmina e componentes da lâmina basal como a laminina e o colágeno IV (Telgmann e Gellersen, 1998; Salamonsen *et al.*, 2003).

A PRL é da família de hormônios semelhantes a prolactina da hipófise e sua síntese na interface materno-fetal ocorre em células gigantes trofoblásticas, em murinos, ovinos e bovinos (Soares, 2004) e em células decíduais, em murinos e humanos (Gu *et al.*, 1994b; Orwig *et al.*, 1997; Salamonsen *et al.*, 2003; Soares, 2004; Bany e Cross, 2006). Ela tem ação como hormônio e como citocina (Soares, 2004). A síntese na interface materno-fetal de PRL pode assegurar a sobrevivência das células decíduais (Gu *et al.*, 1994a, b; Tessier *et al.*, 2001; Soares, 2004). Durante a gestação, a decídua aumenta de tamanho pela proliferação celular e posteriormente regride, à medida que a gestação avança, para permitir o crescimento placentário e fetal (Tissier *et al.*, 2001). A regressão se dá pelo processo de apoptose, que ocorre mais intensamente quando há redução do receptor de PRL (Gu *et al.*, 1994a, b; Gu *et al.*, 1996). Isso ocorre porque a PRL tem efeito anti-apoptótico, via PI3K, nas células decíduais (Tessier *et al.*, 2001). A realização de hibridização *in situ* de células da decídua e do deciduoma revelou que a síntese de PRL ocorre, tão somente, no sítio de implantação do blastocisto, ou seja, não ocorre no deciduoma e nem nas regiões uterinas entre os sítios de implantação (Bany e Cross, 2006). Isso demonstra a necessidade da presença do trofoblasto com seus estímulos parácrinos para a síntese de PRL pelas células decíduais. Sabe-se que a PRL A de origem trofoblástica promove a diferenciação, proliferação e migração das células uNKs por ter ação semelhante a IL15, aumentando a mobilização de cálcio intracelular (Ain *et al.*, 2003b). Por isso, pode-se inferir que a PRL de origem tecidual também module as uNKs (Kim *et al.*, 1999; Tessier *et al.*, 2000; Soares, 2004). Além disso, as proteínas da família da PRL também vão estimular a demanda de hemácias e plaquetas na região de decídua, estimular vias de sinalização celular e dependendo do tipo de PRL pode ter efeito agonista ou antagonista na angiogênese decidual e placentária (Soares, 2004). Tanto a PRL quanto o IGFBP1 também podem ser responsáveis por restringir a invasão trofoblástica (Kim *et al.*, 1999; Tessier *et al.*, 2000).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas ligantes (IGFBPs) são reguladores parácrinos do crescimento e do desenvolvimento tecidual (Carter *et al.*, 2006). Normalmente os IGFs e IGFBPs são expressos nos sítios de ação biológica, sendo, portanto, amplamente expressos na interface materno-fetal de camundongos (Carter *et al.*, 2006). O IGFBP-I serve como modulador do IGF-II agindo sinergicamente a este e estimulando a migração trofoblástica (Irving e Lala, 1995; Fazleabas *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2006). Múltiplos fatores contribuem para a regulação da expressão gênica de IGFBP-1 e dentre eles

podem ser citados a insulina, glicocorticoides, P4, citocinas e a hipóxia (Kim e Fazleabas, 2004). O cultivo de células decíduais de humanos associado a P4 e relaxina aumenta a síntese de PRL e IGFBP-1 associada a maior confluência das culturas e mudanças morfológicas como maior número de grânulos citoplasmáticos bem como junções do tipo *gap* mais evidentes (Lane *et al.*, 1994). Além disso, a dissociação dos filamentos de actina durante o remodelamento decidual em babuínos é essencial para a expressão de IGFBP-1 (Kim *et al.*, 1999). A IL1 $\beta$  induz a expressão de COX-2, PGE2 sintase e na presença de hormônios esteroides também há expressão de IGFBP-1 nos fibroblastos estromais em humanos e babuínos (Strakova *et al.*, 2000; Fazleabas *et al.*, 2004; Bazer *et al.*, 2009). O IGF-II é secretado pelo trofoblasto extraviloso e exerce efeito biológico junto ao receptor IGF-I (IGF-IR) (Fazleabas *et al.*, 2004). O mRNA para IGF-II é fortemente expresso no mesoderma e nos vasos sanguíneos fetais no início da gestação e mais tardiamente nas células de glicogênio, enquanto que na glândula metrial há expressão de mRNA para IGFBP-2, -5 e -6 (Carter *et al.*, 2006). Outro potente modulador positivo da expressão gênica de IGFBP-1 é o FOXO1 (Kim e Fazleabas, 2004).

Outra função da decídua é a prevenção da rejeição imunológica do embrião/feto, semi-halogênico, por meio da síntese e secreção de citocinas. As citocinas e quimiocinas também estão marcadamente presentes na interface materno-fetal das espécies de placentação do tipo hemocorial. Isso se deve principalmente à infiltração, da região de decídua, por células da linhagem leucocitária, além de serem sintetizadas também por células decíduais e trofoblastos. As citocinas e quimiocinas regulam o desenvolvimento do embrião de murinos, primatas humanos e não humanos. Em humanos, foi documentado o efeito combinado de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL1 $\beta$  em promover falha na gestação devido à perda de suprimento sanguíneo e, conseqüente, morte embrionária (Peyman e Hammond, 1992). Os IFNs, tipo I e II, são sintetizados pela placenta e células decíduais em humanos (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1996; Bazer *et al.*, 2009). Eles regulam a proliferação do trofoblasto e outras células na decídua, além de exercerem efeito imunológico (Hess *et al.*, 2007). Em murinos, a expressão de IFN $\alpha$  e do gene regulador de IFN1, no útero, aumenta entre os dias 1 e 4 pós-coito e reduz após a implantação (Li *et al.*, 2001). Já o IFN $\gamma$  é expresso pelas células epiteliais do lúmen e das glândulas endometriais uterinas, pelas células trofoblásticas e pelas células da glândula metrial de camundongos com efeito na angiogênese (Monk *et al.*, 2005). Em um estudo *in vitro*, foi observado que o TNF $\alpha$  e o IFN $\gamma$ , sintetizados por miofibroblastos, reduziram o crescimento vascular por inibir a proliferação das células endoteliais e a síntese de colágeno (Sato *et al.*, 1990).

### **3. Invasão de células trofoblásticas na decídua**

O embrião, constituído por células semi-halogênicas em relação a mãe, é revestido por trofoblastos e invade a parede do útero resultando na formação da placenta, do tipo hemocorial, nas gestações de murinos, primatas humanos e não humanos (Bell, 1983; Cross *et al.*, 1994; Goldman-Wohl e Yagel, 2002; Krüssel *et al.*, 2003; Lindhard *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009; Harris, 2010; Plaisier, 2011; Croy *et al.*, 2012). A invasão nos carnívoros domésticos, cão e gato, também é um pouco mais invasiva dando origem a uma placenta endoteliocorial (Bazer *et al.*, 2009). Contudo, em ruminantes a placenta é sineteliocorial e em

suínos e equinos é epiteliocorial constituindo uma interação, na interface materno-fetal, muito superficial e, portanto, induzindo uma transformação decidual mais sutil (Bazer *et al.*, 2009).

A invasão pelo blastocisto, nos indivíduos de placentação do tipo hemocorial, tem que ser, portanto, muito bem orientada para que não haja rejeição imune e nem expoliação materna por invasão excessiva do trofoblasto (Croy e Morphy, 2008; Erlebacher, 2013). Colunas de células trofoblásticas extravilosas, ou citotrofoblastos, desenvolvem-se a partir de vilosidades de ancoragem. Os trofoblastos extra-vilos se desprendem e passam a migrar na decídua materna em direção aos vasos sanguíneos e glândula metrial (Bazer *et al.*, 2009; Erlebacher, 2013). Estas células invadem a decídua e o miométrio superficial, pela própria decídua ou através das extremidades distais das artérias espiraladas. Os trofoblastos invasores interagem com células do estroma decidualizado, células glandulares e células do sistema imunológico materno (Pijnenborg *et al.*, 1983; Goldman-Wohl e Yagel, 2002; Aplin e Kimber, 2004; Riley, 2008; Sharma *et al.*, 2016).

Vários experimentos demonstram que as citocinas e os fatores de crescimento são cruciais para a regulação da invasão trofoblástica (Fest *et al.*, 2007; Knöfler, 2010; Modi *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2016). As secreções deciduais contêm grandes quantidades de fatores pró-invasivos que incluem a IL1b, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL13, IL15, Eotaxina CCL11, IP-10 e RANTES, e fatores anti-invasivos IL10, IL12 e VEGF. Isso tem sido sugerido que estes fatores deciduais promovem a invasão trofoblástica, regulando a expressão de proteases e integrinas utilizando as vias STAT nas células trofoblásticas (Fest *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2016). Além disso, o trofoblasto também estimula a migração de outras células para a decídua como comprovado por um estudo *in vitro* (Fest *et al.*, 2007). Este fato se dá pelo aumento da síntese e da secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL6, IL8 e TNF $\alpha$ , e quimiocinas, como oncogene relacionado ao crescimento  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), proteína inflamatória de macrófagos1 $\beta$  (mMIP1 $\beta$ ) e RANTES que estimulam a quimiotaxia de macrófagos (Fest *et al.*, 2007). Um outro estudo *in vitro* revelou a influência das células do blastocisto sobre a expressão gênica das células deciduais em humanos. Neste estudo, as células deciduais cultivadas juntamente com as células trofoblásticas humanas aumentaram a expressão de vários genes e reduziram outros. Os que aumentaram mais a sua expressão foram as quimiocinas CXCL e IL8, CXCR4, CCL8, Pentraxina 3 (PTX3), IL6 e genes reguladores do interferon, além do TNFAIP6 (proteína indutora de TNF $\alpha$ ) e as MMP1, MMP10 e MMP14. Essas proteases facilitam a migração da célula trofoblástica no parênquima decidual, sendo sua migração, portanto, autorregulada. A presença das células trofoblásticas no cultivo, entretanto, geraram redução da expressão de fatores de crescimento tais como o IGF1, FGF1 e TGF $\beta$ 1. Esses dados permitiram reafirmar que as células deciduais sofrem influência dos produtos secretados pelo trofoblasto (Hess *et al.*, 2007).

O sítio de implantação é o único local anatômico onde células da placenta, de origem fetal, semi-halogênicas, interagem com o tecido materno. Os trofoblastos intersticiais migram em direção as artérias e as invadem. Em humanos, a colonização das artérias espiraladas uterinas por células trofoblásticas se dá por volta da 8ª semana de gestação, sendo intensificado após a 10ª semana (Bazer *et al.*, 2009; Plaisier *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013). O trofoblasto invade a

vasculatura via parede vascular ou migração intraluminal (Whitley e Carwright, 2010). A invasão do trofoblasto é regulada por vários fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão, proteases e radicais de oxigênio. Estes fatores influenciam tanto o processo invasivo como também o fenótipo dos trofoblastos que passam a exibir várias moléculas de adesão, semelhantes ao das células endoteliais, em preparação para a invasão endovascular (Zhou *et al.*, 2003).

#### **4. Invasão de células imunes na decídua**

A reprodução é fundamental para a manutenção das diferentes espécies de animais e para o homem. Entretanto, o sucesso da gestação é um enigma para os imunologistas uma vez que o sistema imunológico materno reconhece a presença do tecido semi-halogênico, de origem fetal, contudo não o trata como um corpo estranho (Baines *et al.*, 1997; Tranchot-Diallo *et al.*, 1997; Moffet e Loke, 2006; Croy e Murphy, 2008; Makrigiannakis *et al.*, 2008; Ackerman *et al.*, 2012; Bondarenko *et al.*, 2012; Erlebacher, 2013a e b). Principalmente as espécies com a placenta do tipo hemocorial como as de murinos, primatas humanos e não humanos nas quais os embriões entram em íntimo contato com os tecidos maternos (Bell, 1983; Cross *et al.*, 1994; Goldman-Wohl e Yagel, 2002; Krüssel *et al.*, 2003; Lindhard *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009; Harris, 2010; Plaisier, 2011; Croy *et al.*, 2012). E a explicação é justamente a criação de um tecido diferenciado que funciona como uma barreira entre o sistema imunológico materno e o tecido fetal, que é a decídua (Baines *et al.*, 1997; Tranchot-Diallo *et al.*, 1997; Moffet e Loke, 2006; Croy e Murphy, 2008; Makrigiannakis *et al.*, 2008; Ackerman *et al.*, 2012; Bondarenko *et al.*, 2012; Erlebacher, 2013a e b).

Durante a decidualização além das células trofoblásticas, também se infiltram e proliferam, na região de decídua, as células leucocitárias (Stewart e Peel, 1977; Stewart e Peel, 1978; Bulmer *et al.*, 1987; Makrigiannakis *et al.*, 2008). As células imunes infiltram no endométrio no período pós-ovulatório. Na ausência de gestação, seu número declina durante a menstruação. Entretanto, caso a fertilização ocorra, o número de células inflamatórias aumenta. Em humanos isso ocorre mesmo após a 20ª semana de gestação (Van Den Heuvel *et al.*, 2005). As principais são as células *Natural Killer* uterinas (uNKs), macrófagos e células dendríticas, e em menor quantidade, linfócitos (Stewart e Peel, 1977; Stewart e Peel, 1978; Bulmer *et al.*, 1988). No primeiro trimestre da gestação em humanos, 30% das células do estroma são leucócitos, sendo 75% desses leucócitos constituídos pelas células *Natural Killer* uterinas (uNKs) (Bulmer *et al.*, 1991). Postula-se que a migração dos leucócitos seja regulada direta e indiretamente pelos hormônios (Henderson *et al.*, 2003). Além disso, citocinas e quimiocinas derivadas do trofoblasto têm um papel no recrutamento das uNKs e de macrófagos para o sítio de implantação (Hanna *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Fest *et al.*, 2007).

Esses leucócitos assumem diversas funções ao longo da gestação, coordenando o remodelamento vascular e influenciando o perfil imunológico na interface materno-fetal (Stewart e Peel, 1977; Stewart e Peel, 1978; Bulmer *et al.*, 1988; Moffett-King, 2002; Hanna *et al.*, 2006; Herington e Bany, 2007; Kopcow e Karumanchi, 2007; Yang *et al.*, 2008; Lash *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Isso ocorre porque essas células expressam

mRNA e proteínas para vários fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, incluindo fatores angiogênicos e proteases como Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF-c, PlGF, uPA, uPAR e MT1-MMP (Lash *et al.*, 2006; Naruse *et al.*, 2009). Algumas funções das células uNKs seriam a modulação imunológica, o controle da invasão das células trofoblásticas, transformação vascular, decidualização e a indução da apoptose dos trofoblastos extravilosos (Head, 1996; Guimond *et al.*, 1997; Ashkar *et al.*, 2000; Moffett-King, 2002; Croy *et al.*, 2003; Oh e Croy, 2008; Mallidi *et al.*, 2009; Lash *et al.*, 2010; Acar *et al.*, 2011). Já os macrófagos são células imunossupressoras, que estão presentes na decídua de murinos, primatas humanos e não humanos, e controlam a formação e o crescimento placentário e tem função fagocitária (Bulmer *et al.*, 1988; Baines *et al.*, 1997; Reister *et al.*, 1999; Heikkinen *et al.*, 2003; Montovani *et al.*, 2004; Laskarin *et al.*, 2005; Renaud e Grahan, 2008; Geissmann *et al.*, 2010; Houser *et al.*, 2011; Schonkeren *et al.*, 2011; Tagliani *et al.*, 2011; Hamilton *et al.*, 2012). Durante o primeiro trimestre da gestação, 10% das células imunes são macrófagos. Já, as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos presentes no sítio de implantação e têm mostrado o potencial para modular a resposta angiogênica e produzir fatores de crescimento angiogênicos e quimiocinas. Sua ação pró-angiogênica e anti-angiogênica, ou ambas, depende parcialmente do seu perfil de maturação, que é dependente de sinais derivados das células uNKs (Barrientos *et al.*, 2009).

#### **4.1. Células uNKs**

##### *Diferenciação e fenótipo*

Há muitos anos detectou-se a presença de uma célula volumosa com grânulos exuberantes na decídua e principalmente no agregado linfóide mesometrial da gestação inicialmente denominadas células granulares da glândula metrial (Stewart e Peel, 1977; Stewart e Peel, 1978; Peel *et al.*, 1983; Bulmer *et al.*, 1987; Stewart e Peel, 1999a e b; Bulmer e Lash, 2005). Posteriormente, com a evolução das técnicas moleculares, foi possível verificar que se tratavam de células da linhagem leucocitária, linfócitos (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003), mais especificamente células *Natural Killer* uterinas (uNKs- do inglês *uterine Natural Killer cells*) (Croy e Kiso, 1993; Guimond *et al.*, 1997; Guimond *et al.*, 1998; Ashkar e Croy, 2001). A ligação das células granulares da glândula metrial às células uNKs na interface materno-fetal foi demonstrada em quatro linhagens de camundongos deficientes em células NK e T, os transgênicos *tge26* (Wang *et al.*, 1994; Guimond *et al.*, 1997),  $p56^{lck^{-}}/IL2R\beta\gamma^{-}$  (DiSanto *et al.*, 1996; Guimond *et al.*, 1997) e  $RAG2^{-}/\gamma_c^{-}$  (Ashkar *et al.*, 2000; Greenwood *et al.*, 2000). Esses achados foram somados ao fato de que camundongos deficientes somente em linfócitos T e B ( $T^{-}$ ,  $B^{-}$ ,  $NK^{+}$ ) apresentavam uma alta densidade de células granulares da glândula metrial, portanto essas células não poderiam ser outros leucócitos se não as uNKs. Outra comprovação de que as células granulares uterinas são realmente as células NKs foi quando, após o enxerto de medula óssea de camundongos  $T^{-}$ ,  $B^{-}$ ,  $NK^{+}$ , restaurou a população de células uNKs em camundongos deficientes em células NK ( $NK^{-}$ ). Os indivíduos com a população de células uNKs restaurada tiveram fetos viáveis por terem uma diferenciação decidual mais próxima ao normal, reduzindo anomalias deciduais e vasculares e aumentando o tamanho da placenta (Guimond *et al.*, 1998; Ashkar *et al.*, 2000).

As células uNKs incluem células não granulares (não ativadas ou imaturas) e granulares (ativadas ou de maturidade completa ou, ainda, senescentes) (Croy *et al.*, 1996; Head, 1996; King *et al.*, 1996; Herington e Bany, 2007). Em mulheres, as células uNKs estão associadas aos trofoblastos extravilosos, enquanto que em murinos elas são encontradas a partir do sexto dia de gestação na decídua mesometrial e a partir do oitavo dia elas ficam densamente agregadas, dispondo-se angiocentricamente e criando um microambiente distinto, o chamado agregado linfóide mesometrial da gestação ou glândula metrial (Croy, 1999; Caligiuri, 2008). As células uNKs se organizam angiocentricamente à artéria espiralada uterina e seus ramos, que transpassam a parede uterina rumo à placenta em desenvolvimento, formando a glândula metrial (Peel e Stewart, 1989). Células uNKs também são observadas infiltrando-se na parede uterina de suínos (Tayade *et al.*, 2007). Entre os dias 15 e 28 de gestação há crescimento de aproximadamente três vezes o número de células uNKs no endométrio nos sítios de implantação uterina em suíno (Engelhardt *et al.*, 2002; Tayade *et al.*, 2007). A característica morfológica das uNKs em suínos é um pouco semelhante as que ocorrem em humanos e murinos pois elas assumem um volume maior e tornam-se granulares (Engelhardt *et al.*, 2002). Entretanto, em suínos o diâmetro das uNKs chega a 5 $\mu$ m enquanto que em humanos e murinos elas chegam a 49-805 $\mu$ m (Engelhardt *et al.*, 2002; Tayade *et al.*, 2007)

As células uNKs são linfócitos que participam da imunidade inata contra alguns vírus e células tumorais. As células NK têm um conjunto limitado de receptores para antígenos, ao contrário das células T e B. A interação da célula NK com uma célula infectada por vírus ou célula tumoral ativa uma cadeia de sinalização intracelular que induz a síntese de IFN $\gamma$  e mediadores da função citolítica como as proteases perforina (Zheng *et al.*, 1991), serina (Parr *et al.*, 1991) e granzima B. As células uNKs são as primeiras a surgirem na decídua durante a fase secretória em mulheres, principalmente no sítio de implantação (Erlebacher, 2013a, b). Até recentemente, as células NK dos murinos foram tipicamente identificadas como células que expressam o DX5 (CD49b) que é um marcador de superfície, mas falta a expressão do complexo de sinalização do TCR ou CD3 TCR-associado. A expressão das duas moléculas, DX5 e TCR/CD3, caracteriza as células T NK comuns no compartimento sanguíneo e outros tecidos, contudo esse fenótipo é raro no útero gravídico (Boyson *et al.*, 2008).

Atualmente, as células NK são mais comumente identificadas como tendo um fenótipo de superfície CD3<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup>. O CD122 é a cadeia  $\beta$  dos receptores para a IL2 e IL15 que são considerados fatores de crescimento e de sobrevivência para as células NKs. A IL2 e 15 são expressas por precursores hematopoiéticos das células que darão origem à linhagem das NK (Carson *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1998). Todas as células NK também expressam o receptor de superfície NKp46 (Moretta *et al.*, 2000).

No útero dos murinos não gestantes, as células NKs são raras, homogeneamente distribuídas, não apresentam granações, são pequenas como linfócitos não reativos e fenotipicamente semelhantes às células do compartimento sanguíneo (Herington e Bany, 2007; Zhang *et al.*, 2011). Com a implantação do blastocisto, mais especificamente no sítio de implantação, seu fenótipo é alterado e morfológicamente apresenta maior volume (diâmetro superior a 40  $\mu$ m),



com grânulos citoplasmáticos variando de eosinofílicos a basofílicos e proeminentes (Herington e Bany, 2007; Picut *et al.*, 2009). As células uNKs infiltram-se no sítio de implantação do blastocisto, dispostas tanto na decídua basal quanto na glândula metrial, onde se intercalam entre as camadas de músculo liso dispostas concentricamente ao redor dos vasos sanguíneos sendo denominadas células NK uterinas (uNKs). Na decidualização induzida, ou decíduoma, as células uNKs apresentam-se com morfologia semelhante, contudo encontram-se em menor número e distribuídas homogêneas no endométrio uterino (Herington e Bany, 2007; Kashiwagi *et al.*, 2007). Além disso, na decídua há maior expressão de *Nkg7*, *Perforina*, *granzima E* e *granzima F* do que no decíduoma (Kashiwagi *et al.*, 2007). Tem-se discutido a utilização do termo glândula metrial, uma vez que se sabe que as células granulares são linfócitos e não células glandulares como acreditava-se antigamente. Por isso, atualmente a glândula metrial é também conhecida como agregado linfoide mesometrial da gestação (ALMg), como sugerido por Croy (1999), ou triângulo metrial.

As uNKs são os leucócitos mais abundantes na decídua, constituindo aproximadamente 70% destes (Trundley e Moffett, 2004; Bulmer *et al.*, 2010). Em camundongos, sua proporção varia de aproximadamente 50% no dia 5,5 à 10% no dia 9,5 de gestação (Croy *et al.*, 2012). O número de células uNKs na rata aumenta com o avançar da gestação, principalmente entre o 9º e o 14º dia de gestação (Ashkar *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Picut *et al.*, 2009). Em murinos, a pesquisa de uNKs tem sido realizada por meio da citometria de fluxo (Yadi *et al.*, 2008; Mallidi *et al.*, 2009). Em um estudo realizado com uma suspensão de células deciduais, por citometria de fluxo, as células uNKs foram caracterizadas fenotipicamente como CD3<sup>-</sup> CD122<sup>+</sup> (Yadi *et al.*, 2008). Uma parte das células uNKs expressam DX5 e NK1.1 (em camundongos C57BL/6), mas não tem reatividade com a lectina DBA, semelhantes às células NK do compartimento sanguíneo. Um outro fenótipo de células uNKs foi encontrado, o DX5<sup>-</sup> NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup>. Morfológicamente essas células são volumosas e com granulações citoplasmáticas exuberantes tais como as células uNKs clássicas. Este fenótipo não é encontrado fora do útero gestante. As células uNKs DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup> também expressam baixos níveis de Nkp46. Aos 6,5 DG, há um número aproximadamente igual de células DX5/NK1.1<sup>+</sup> DBA<sup>-</sup> e DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup>, mas aos 9,5 DG aproximadamente 90% das células são DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup>.

A lectina DBA se liga especificamente a N-acetilgalactosamina terminal (GalNAc) e tem sido amplamente utilizada para estudos microscópicos e ultra-estruturais das células uNK de camundongos porque reage tanto com a membrana plasmática quanto com os grânulos das células uNKs (Paffaro *et al.*, 2003). Classicamente, a coloração para estudos de células uNK de camundongos por microscopia de luz era o ácido periódico de Schiff (PAS) (Peel e Stewart, 1989). Os grânulos citoplasmáticos das uNKs reagem ao PAS, contudo as células imaturas não são identificadas por essa coloração pois não possuem os grânulos ainda bem desenvolvidos. As células que marcam com PAS formam um subtipo de células fibroblásticas que se diferenciam em uNK por terem receptores de IL15 em sua superfície (Zhang *et al.*, 2009). E as células lectina DBA<sup>+</sup> são as células derivadas da circulação sanguínea que se diferenciaram no útero gravídico (Zhang *et al.*, 2009). Um estudo conduzido por Chen e colaboradores (2012) prova que a quantificação tão somente por lectina DBA não fornece a marcação de toda a população

de células uNKs, sendo necessária a realização da marcação com PAS para conseguir fazer uma avaliação mais fidedigna da população total de uNK da decídua.

Acredita-se que as células uNKs com fenótipo DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup> sejam recrutadas por estímulos quimiotáticos do embrião em implantação, do compartimento sanguíneo circulante materno, e diferenciem no sítio de implantação (Zhang *et al.*, 2009). Os fatores quimiotáticos e de diferenciação ainda são desconhecidos, muito embora várias quimiocinas já sejam conhecidas (Chantakru *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2005). Interessantemente, as células uNKs recrutadas aparecem pela primeira vez na região central da decídua basal, próximo aos vasos sanguíneos que expressam constitutivamente VCAM-1, sugerindo que esta molécula de adesão participe do recrutamento das precursoras das uNKs (Kruse *et al.*, 2002). As células recrutadas também proliferam enquanto se diferenciam, provavelmente por meio da ação de IL15 sintetizada pelas células decíduais. O mecanismo exato de ação da IL15 ainda não está bem estabelecido, contudo ela é essencial para a sobrevivência das células NK e sua proliferação na medula. Um estudo demonstrou que o tratamento de células NK do sangue de humanos com IL15 e TGFβ combinados induziu a sua diferenciação em células semelhantes as células uNKs, o que provavelmente pode ocorrer nos murinos (Keskin *et al.*, 2007). A origem das células uNKs de fenótipo DX5/NK1.1<sup>+</sup> DBA<sup>-</sup> ainda não foi completamente esclarecida, muito embora seja provável que estas células derivem das células NK residentes do útero no momento da implantação. É também provável que elas sejam as células PAS<sup>+</sup> DBA<sup>-</sup> vistas em seções histológicas decíduais. O que induz a diferenciação ainda permanece desconhecido (Yadi *et al.*, 2008; Chiossone *et al.*, 2014).

O fenótipo das células uNKs de murinos é o CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, que também as difere das células NK do compartimento sanguíneo (Erlebacher, 2013a, b). Em humanos, aproximadamente 90% das células do sangue periférico são CD56<sup>dim</sup> e expressam também altos níveis do FcγRIII (CD16) e os restantes 10% são CD56<sup>bright</sup> e CD16<sup>dim/neg</sup> (Cooper *et al.*, 2001). Outro fator de distinção é o padrão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento sintetizados e liberados pelas células uNKs (Erlebacher, 2013a, b). As células NK CD56<sup>bright</sup>, por exemplo, sintetizam grande quantidade de citocinas do tipo 1 (IFNγ, TNFβ e IL10) e 2 (IL5 e IL13) em relação as células NK CD56<sup>dim</sup> (Cooper *et al.*, 2001). Tem sido sugerido que as células NK residentes no endométrio uterino e as recrutadas para a decídua, através de quimiotaxia pela IL15 e proteína inflamatória de macrófagos 1β (MIP1β, do inglês: *Macrophage Inflammatory Protein-1β*) (Kitaya *et al.*, 2003b), passam por um processo de diferenciação tornando-se células especializadas e com funções singulares ao longo gestação (Acar *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013a, b). A mudança do fenótipo da NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>, do sangue periférico, para uNK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> tem sido atribuída a associação do TGFβ1 com IL15 (Keskin *et al.*, 2007). O TGFβ1 e a IL15 são sintetizados em grande quantidade pelas células decíduais ao longo da gestação (Ye *et al.*, 1996; Kitaya *et al.*, 2000; Ashkar *et al.*, 2003; Erlebacher, 2013a, b). Em camundongos, a IL15 também é um fator primordial para a diferenciação das células uNK uma vez que essas células não são encontradas na decídua de camundongos *knockout Il15<sup>-/-</sup>* (Ashkar *et al.*, 2003). A síntese e a secreção de IL15 declinam concomitantemente ao número de células uNKs ao longo da gestação (Ye *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2011). Macrófagos decíduais também expressam níveis elevados de IL15 em camundongos e humanos (Ye *et al.*, 1996; Kitaya *et al.*,

2000; Verma *et al.*, 2000). Entretanto, as células uNKs se diferenciam no útero em casos de camundongos *Csf1<sup>op/op</sup>* (fator de crescimento de macrófagos 1) que possuem menor quantidade de macrófagos decíduais (Kiso *et al.*, 1992). Este fato permite concluir que a IL15 sintetizada pelas células decíduais e endoteliais são mais relevantes no processo de quimiotaxia e diferenciação das uNKs do que a sintetizada pelos macrófagos ou que sua síntese seja suprida por elas (Kiso *et al.*, 1992; Kitaya *et al.*, 2000; Kitaya *et al.*, 2003a).

As células uNKs também diferem das células NK do compartimento sanguíneo pelo padrão de síntese, uma vez que expressam altos níveis de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiogênicos (Ashkar e Croy, 2001; Ashkar *et al.*, 2003; Hanna *et al.*, 2006; Plaisier, 2011). Por isso, somente as células uNKs são capazes de induzir a migração trofoblástica, tanto *in vitro* como *in vivo*, por meio da secreção de IL8, IFN e quimiocinas (Hanna *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2013). O recrutamento, a maturação e a diferenciação das células uNKs são dependentes da síntese de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL15 e IL18 pelas células decíduais (Ashkar *et al.*, 2003). Mas existem evidências de que as células trofoblásticas também promovam a proliferação, diferenciação e migração das uNKs. Isso ocorre pela síntese de uma citocina específica sintetizada pela célula trofoblástica, a proteína A semelhante a prolactina (PLP A). A PLP A age, assim como a IL15, aumentando a mobilização do cálcio intracelular. Entretanto, a PLP A, ao contrário da IL15, reduz a síntese de IFN $\gamma$  pelas células uNKs, um importante mediador de sua função (Ain *et al.*, 2003b), pois regula a expressão de, aproximadamente, 0,5% do genoma dos murinos (Ashkar e Croy, 2001). Em suínos, as uNKs foram reconhecidas por expressar CD16<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> semelhante às do compartimento sanguíneo, o que possibilita a análise de que as células volumosas e granuladas provêm do compartimento sanguíneo e diferenciam-se no sítio de implantação (Engelhardt *et al.*, 2002). A distribuição dessas células pode ser observada próxima ao epitélio luminal, ao redor das glândulas endometriais e vasos sanguíneos e por todo o estroma, uma vez que a placenta de suíno é difusa (Bischof *et al.*, 1994 e 1995).

Em suínos, o IFN $\gamma$  sintetizado pelo trofoblasto tem sido relacionado ao recrutamento e diferenciação das uNKs que aumentam nos sítios de implantação no início da gestação (Engelhardt *et al.*, 1997). Em ovinos, o trofoblasto do embrião e do feto sintetiza e secreta IFN $\tau$ ; em suínos, secreta os IFN $\delta$  e IFN $\gamma$ , em equinos, secreta o IFN $\delta$  e o conceito e/ou a decídua de roedores secretam IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (Bazer *et al.*, 2009, 2010). A PLP A e a IL15 possuem ações opostas no que diz respeito à síntese e liberação de IFN $\gamma$  pelas células uNKs. Enquanto a PLP A do trofoblasto inibe a síntese de IFN $\gamma$  (Ain *et al.*, 2003b) e reduz a atividade citolítica da uNK (Müller *et al.*, 1999), a IL15 aumenta a síntese de IFN $\gamma$  (Ain *et al.*, 2003b). O declínio de IFN $\gamma$  na decídua é essencial para permitir o desenvolvimento placentário, pois ele inibe o crescimento das células trofoblásticas (Ain *et al.*, 2003a). Entretanto, as células uNKs, situadas no agregado linfóide mesometrial da gestação, continuam a expressar grande quantidade de IFN $\gamma$ . Este achado indica que o PLP A proveniente das células trofoblásticas tem ação parácrina sobre as células uNKs (Ain *et al.*, 2003b). A síntese contínua de IFN $\gamma$  pelas células uNKs no terço médio da gestação está possivelmente relacionada com o remodelamento vascular que ocorre concomitantemente (Ashkar e Croy, 2001; Bulmer e Lash, 2005). Esta é uma forma de contínuo

aprimoramento da rede vascular decidual que permite um suprimento sanguíneo adequado para o feto em crescimento exponencial (Ashkar e Croy, 2001).

Os interferons e seus receptores encontram-se na interface materno fetal e apresentam ação antiviral, anti-proliferativa e imunossupressora (Bazer et al, 2009; Bazer *et al.*, 2010). O efeito imunossupressor se dá pela redução da proliferação mitótica dos linfócitos T e B, por regular a diferenciação celular e a expressão de antígenos na superfície celular, por estimular a expressão de  $\epsilon$ -globina, um componente da hemoglobina embrionária, além de suprimir a expressão de proto-oncogenes como EGFR, c-erB-2 e CSF1R, o que ocasiona o comprometimento do crescimento e diferenciação trofoblástica (Aboagye-Mathiesen *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 2007; Bazer *et al.*, 2009).

Aborto, natimortalidade, crescimento intrauterino retardado e peso baixo ao nascimento têm sido relacionados a alterações tanto vasculares como imunológicas na interface materno-fetal que podem ser consequências de outras doenças. Ratas com hipo e hipertireoidismo apresentam redução da expressão de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  pelas células trofoblásticas, respectivamente, dependendo do período gestacional (Silva *et al.*, 2014), enquanto que mulheres com hipotireoidismo têm redução da expressão de IL4 e IL10 pelas células deciduais (Twig *et al.*, 2012). É importante ressaltar que alterações na população e atividade citolítica das células uNKs no endométrio de mulheres gestantes estão associadas a complicações gestacionais como aborto e restrição de crescimento intrauterino (Ashkar *et al.*, 2003; Acar *et al.*, 2011). Além disso, camundongos que não possuem células uNKs são férteis, contudo exibem remodelamento vascular uterino inadequado, subdesenvolvimento da decídua e baixo peso fetal, destacando a importância das células uNKs na interface materno fetal (Colucci *et al.*, 2011).

Citocinas inflamatórias produzidas pelas células deciduais também influenciam a migração de células trofoblásticas e uNKs em direção à decídua (Hanna *et al.*, 2006), principalmente iNOS e TGF $\beta$ . Enquanto iNOS estimula a migração celular intrauterina, o TGF $\beta$  reduz (Irving e Lala, 1995; Silva *et al.*, 2014). Entretanto, o processo inflamatório deve ser controlado pois, caso contrário, podem ocorrer perdas embrionárias e/ou fetais. Por isso, durante a gestação há necessidade de estabelecer um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal, imprescindível para o desenvolvimento e crescimento adequados do feto sem, contudo, comprometer a imunidade contra patógenos (Weinberg, 1987; Raghupathy, 1997). Por isso, ocorre aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL4, IL10, iNOS e TGF $\beta$  (Irving e Lala, 1995; Coulam, 2000; Toder *et al.*, 2003).

#### *Papel das células uNKs na decidualização e remodelamento vascular*

Fortes evidências têm sido demonstradas com relação ao papel das uNKs em promover as mudanças vasculares uterinas (Ashkar *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). O remodelamento é fundamental para a nutrição fetal, com demanda crescente, pois é ele que possibilita maior fluxo sanguíneo para a placenta. O remodelamento da artéria espiralada uterina na decídua permite que o vaso adquira alto calibre e baixa resistência por substituir o revestimento endotelial pelo trofoblasto (Plaisier, 2011; Erlebacher, 2013a). Segundo Smith e colaboradores (2009), o remodelamento vascular em humanos ocorre em duas

fases. Na primeira, há ausência de trofoblastos e as células musculares lisas perivasculares entram em degeneração e apoptose, o que coincide com o acúmulo das células uNKs e macrófagos no local. A segunda fase compreende a migração dos trofoblastos extravilosos para o lúmen dos vasos substituindo as células endoteliais (Smith *et al.*, 2009). Falhas na migração do trofoblasto para os vasos sanguíneos maternos até próximo da camada do miométrio tem sido implicada como causa de pré-eclâmpsia e crescimento intrauterino retardado por má perfusão sanguínea placentária (Young *et al.*, 2010).

A importância das uNK no remodelamento vascular foi evidenciada utilizando-se camundongos *Rag2<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>* e camundongos deficientes em sintetizar IL15 (Ashkar *et al.*, 2000). Esses indivíduos não possuem todas as células da linhagem linfocítica, inclusive células NK, devido à ausência de uma cadeia gama do receptor da citocina IL2rg-codificada (e um componente do receptor da IL15). Camundongos *Rag2<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>* têm a região decidual com menor densidade de células. As arteríolas da decídua desses camundongos apresentam-se espessas e com lúmen reduzido o que contrasta com as arteríolas de paredes finas e dilatadas encontradas em animais normais. Entretanto, quando camundongos *Rag2<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>* são previamente tratados com células da medula óssea há reposição de células NK, células T e B e o remodelamento arteriolar ocorre novamente (Ashkar *et al.*, 2000). Apesar do crescimento feto-placentário não ser prejudicado por estas mudanças, as fêmeas gestantes *Rag2<sup>-/-</sup> Il2rg<sup>-/-</sup>* exibem alterações hemodinâmicas consistentes com uma resposta compensatória sistêmica à perfusão placentária insuficiente (Burke *et al.*, 2010; Leno-Duran *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Defeitos vasculares semelhantes são observados em camundongos *IL15<sup>-/-</sup>* (Ashkar *et al.*, 2003).

Outro fator importante é que a disfunção nas células uNKs em humanos compromete a invasão dos trofoblastos extravilosos nas arteríolas deciduais. Este fato propicia uma perfusão placentária inadequada resultando em pré-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino (Chazara *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013a), o que não tem sido observado em murinos por eles possuírem invasão trofoblástica mais superficial em relação aos humanos (Burke *et al.*, 2010; Leno-Duran *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Essa possibilidade da interação entre as células uNKs e os trofoblastos influenciando o remodelamento vascular decidual tem sido estudada. Fêmeas de camundongos BALB/c gestantes têm os vasos deciduais dilatados somente quando há a presença da molécula de MHC classe I, H2-K<sup>b</sup>, de origem paterna, na superfície trofoblástica, conferindo a essa célula competência imunológica (Madeja *et al.*, 2011). O H2-K<sup>b</sup>, o qual representa o principal grupo de antígenos MHC-I, é expresso pelo trofoblasto que infiltra na decídua somente quando próximo às células uNKs. A localização do antígeno H2-K na membrana citoplasmática do trofoblasto permite o reconhecimento do trofoblasto pelas células do sistema imune materno, principalmente com os receptores Ly49 da superfície de células uNKs. Contudo, a expressão do antígeno H2-K<sup>b</sup>, de origem paterna, pelo trofoblasto, induz o aumento da expressão de Ly49 pelas células uNKs. O receptor Ly49, das uNKs, se liga especificamente na molécula MHC-I das células trofoblásticas, o que corrobora com a interação entre esses dois tipos celulares. Esta interação é maior quanto maior for a halogenia entre mãe e feto, permitindo máxima dilatação da vasculatura decidual com maior aporte nutricional para o feto e, conseqüente, maior peso feto-placentário (Madeja *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual as células uNKs induzem o remodelamento arteriolar na decídua ainda não é conhecido. Contudo a íntima associação das células uNKs com os vasos sanguíneos deciduais associada à elevada expressão de IFN $\gamma$ , entre os dias 9 e 10 de gestação, sugere fortemente a participação desta citocina no mecanismo de remodelamento vascular (Ashkar *et al.*, 2000; Bulmer e Lash, 2005; Monk *et al.*, 2005; Bazer *et al.*, 2009). Sendo assim, as células endoteliais, musculares lisas e deciduais constituem o alvo da ação do IFN $\gamma$  (Bazer *et al.*, 2009). Curiosamente, a expressão de IFN $\gamma$  pelas células uNKs é mais elevada nas células uNKs com fenótipo DX5/NK1.1<sup>+</sup> DBA<sup>-</sup>, que mais se assemelham às células NK esplênicas, do que nas células uNKs DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 2012). Em contrapartida, as células uNKs com fenótipo DX5/NK1.1<sup>-</sup> DBA<sup>+</sup> são as únicas que expressam níveis mais elevados de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF-A e o PlGF, do que as células que exibem o fenótipo DX5/NK1.1<sup>+</sup> DBA<sup>-</sup>, no útero gestante (Chen *et al.*, 2012). Um fato curioso é que as células uNKs têm seu potencial citolítico substancialmente reduzido apesar de sua expressão de perforina e granzima B serem semelhantes às células NK do compartimento sanguíneo (Apps *et al.*, 2008; Manaster e Mandelboim, 2010; Chazara *et al.*, 2011). Este fato possivelmente está relacionado à ameaça em potencial de que as células uNKs representariam para os trofoblastos, semi-halogênicos e invasores, se mantivessem sua atividade citolítica, o que poderia resultar em perdas embrionárias (Apps *et al.*, 2008; Manaster e Mandelboim, 2010; Chazara *et al.*, 2011).

#### *Papel das células uNKs na inflamação intrauterina e aborto*

As células uNKs são conhecidas por terem grânulos citoplasmáticos de granzima B e perforina que são moléculas citotóxicas (Manaster e Mandelboim, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Esta observação é justamente o ponto que mais intriga os estudiosos da imunologia na interface materno-fetal, uma vez que as células uNKs deveriam por em risco a sobrevivência do embrião. Um dos motivos é que o trofoblasto possui baixa expressão de MHC-I, tanto em humanos quanto em murinos, o que deveria incitar a citotoxicidade, o que não ocorre (Raulet, 2006). Uma explicação para este fato seria que a função citolítica das células uNKs é baixa na primeira linha de defesa uterina e que, além disso, as interações do MHC-I com o trofoblasto ocorrem por vias não clássicas (Apps *et al.*, 2008; Mallidi *et al.*, 2009; Manaster e Mandelboim, 2010). Em contraste, alguns trabalhos demonstraram que as células uNKs podem ser embriotóxicas em determinadas circunstâncias (Murphy *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Robertson e colaboradores (2007), camundongos deficientes em IL10 (IL10<sup>-/-</sup>) quando recebiam baixas doses de LPS, mimetizando uma reação inflamatória, não tiveram a IL10 no sítio de implantação para agir como imunossupressora o que resultou em altas taxas de reabsorção embrionária. A reabsorção embrionária foi correlacionada com elevados níveis de TNF $\alpha$  e IL6, citocinas pró-inflamatórias, na decídua no dia 9,5 de gestação (Robertson *et al.*, 2007). A prevenção da perda embrionária pode ser realizada pela depleção de uNKs ou bloqueio do TNF $\alpha$ , mas não pelo bloqueio do IFN $\gamma$  (Murphy *et al.*, 2005). O tratamento com LPS em camundongos *Il10*<sup>-/-</sup> também induziu a migração de células uNKs para a região placentária, bem como aumentou sua atividade citolítica local, dois efeitos que podem também ser inibidos pelo bloqueio do TNF $\alpha$  (Murphy *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009). O mecanismo de perda embrionária pela interação da IL10, TNF $\alpha$ , células uNKs do embrião ainda permanece obscuro (Thaxton e Sharma, 2010). A IL10 é amplamente expressa na região da decídua de

camundongo (Qiu *et al.*, 2009) sendo sintetizada pelas células uNKs e decíduais (Lin *et al.*, 1993; Thaxton e Sharma, 2010). Além disso, a IL10 associada ao fator de crescimento de macrófagos 1 (CSF-1) promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos com características semelhantes aos macrófagos decíduais, mantendo-os não reativos, em humanos. A regulação parácrina da atividade dos macrófagos decíduais e das uNKs ainda não foi bem definida, entretanto observa-se que a proximidade física de ambos os tipos celulares e, portanto, sua possível ação conjunta, promove o remodelamento vascular na decídua em humanos. Macrófagos decíduais e uNKs têm sido incriminados pelas altas taxas de aborto espontâneo em cruzamentos de camundongos fêmeas da linhagem CBA/J com machos da linhagem DBA/2, muito embora o mecanismo específico permaneça desconhecido (Baines *et al.*, 1997). Conjuntamente esses resultados destacam um papel potencial para a excessiva ativação de células uNKs estar relacionada a perdas gestacionais em humanos, sugerindo que haja interação entre as uNKs e os macrófagos (Erlebacher, 2013a).

#### **4.2. Macrófagos**

Os macrófagos e células dendríticas pertencem ao sistema monocítico fagocitário e derivam de precursores mieloides (Varol *et al.*, 2009; Geissmann *et al.*, 2010; Liu e Nassenzweig, 2010; Tagliani *et al.*, 2011). Os macrófagos migram para a interface materno-fetal pela síntese de fatores quimiotáticos sintetizados tanto pelas células decíduais e uNKs, quanto pelas células trofoblásticas (Fest *et al.*, 2007) e estão presentes em todos os períodos gestacionais (Zhang *et al.*, 2017). Os fatores quimiotáticos para macrófagos incluem o oncogene- $\alpha$  relacionado com o crescimento (GRO- $\alpha$ , do inglês *growth-related oncogen- $\alpha$* ), MCP-1 e IL8 (Fest *et al.*, 2007). O macrófago endometrial é a segunda célula da linhagem leucocitária mais abundante na decídua de humanos e camundongos, constituindo aproximadamente 10 a 20% das células (Repnik *et al.*, 2008; Houser *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013a). Sabe-se que de alguma forma eles contribuem para o remodelamento decidual que ocorre, do terço inicial ao médio da gestação, na interface materno-fetal uma vez que possui função pleiotrópica, não somente no útero, mas também em todo organismo (McGarry e Stewart, 1991; Laskarin *et al.*, 2005; Renaud e Graham, 2008; Repnik *et al.*, 2008; Erlebacher, 2013a; Brown *et al.*, 2014). Na interface materno-fetal, o macrófago desempenha a função de detecção de patógenos, apresentação de antígenos e célula imune efetora, o que sugere um papel central na resposta inflamatória e infecções placentárias e decíduais (Renaud e Graham, 2008; Erlebacher, 2013a; Brown *et al.*, 2014). Além disso, os macrófagos decíduais têm sido relacionados com a patogênese da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intrauterino, pelo fato de estarem localizados ao redor dos trofoblastos intersticiais e afetarem diretamente a primeira fase de remodelamento vascular (Renaud e Graham, 2008; Nagamatsu e Schust, 2010; Erlebacher, 2013a). A ação dos macrófagos no remodelamento vascular tem sido estudada há vários anos, desde que comprovou-se que a redução de macrófagos em fibrossarcoma de murinos gerou a redução de sua vascularização (Evans, 1977). Posteriormente foi discutido o seu papel central na angiogênese por participar de todas as etapas deste processo. Isso porque os macrófagos secretam fatores angiogênicos, MMPs, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, como a fibronectina, colágeno e osteopontina, todos fundamentais para o processo de angiogênese (Sunderkötter *et al.*, 1994).

### *Fenótipo, função e distribuição dos macrófagos decíduais*

Os macrófagos decíduais primeiramente foram reconhecidos por expressar CD14 para monócitos/macrófagos. Aproximadamente 70% das células têm a característica incomum, em humanos, de expressar o tipo C de lectina CD209 ou DC-SIGN (molécula de adesão intercelular não integrina específica de células dendríticas-3 - ICAM-3) (Soilleux *et al.*, 2001; Kammerer *et al.*, 2003). O CD209 é um marcador para monócitos imaturos derivados de células dendríticas, mas também é expresso por macrófagos no pulmão, derme (Soilleux *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017), útero não gestante e útero gestante, sendo a expressão neste último 3 à 4 vezes maior (Rieger *et al.*, 2004; Houser *et al.*, 2011; Svensson *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013a).

Já os macrófagos de camundongos são conhecidos por expressarem o marcador de superfície F4/80 que também pode ser usado para identificar as células tanto por citometria de fluxo quanto por imunistoquímica. Tagliani *et al.* (2011) sugeriu que os macrófagos fossem distribuídos em duas subpopulações baseada na expressão de baixos ou altos níveis do antígeno de histocompatibilidade principal II (MHCII). Portanto, os macrófagos uterinos em camundongos são divididos em duas subpopulações: F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>hi</sup> e F4/80<sup>+</sup> MHCII<sup>lo</sup> (Tagliani *et al.*, 2011). A densidade populacional de macrófagos no útero não gestante sofre forte influência dos hormônios ovarianos tendo, portanto, uma variação ao longo do ciclo estral (Pollard *et al.*, 1987; Wood *et al.*, 1992). Além disso, macrófagos MHCII<sup>lo</sup> estão presentes em baixa densidade populacional no útero de camundongos pré-púberes e púberes virgens, bem como no útero até o dia 4,5 de gestação (Tagliani *et al.*, 2011). Com o avançar da gestação, a densidade de macrófagos decíduais reduz no sítio de implantação mas aumenta no miométrio tendo uma expansão homeostática com densidade celular constante (Tagliani *et al.*, 2011). Entretanto, em humanos a população de macrófagos mantém-se relativamente constante na decídua ao longo da gestação (Vince *et al.*, 1990).

Macrófagos MHCII<sup>hi</sup> são três vezes mais frequentes que os macrófagos MHCII<sup>lo</sup> no útero não gestante de camundongos tratados com progesterona. Quando esses indivíduos ficam gestantes o número absoluto expande por sítio de implantação, mantendo, assim, a mesma proporção (Tagliani *et al.*, 2011). A densidade de ambos os macrófagos MHCII<sup>lo</sup> e MHCII<sup>hi</sup> declina progressivamente na decídua sendo escassos por volta do dia 12,5 de gestação (Tagliani *et al.*, 2011). Tagliani e colaboradores (2011) sugerem uma explicação para estas diferenças na dinâmica populacional dos macrófagos decíduais. Os níveis de expressão de mRNA de *Csf1* são aproximadamente 50 vezes maior, no miométrio em crescimento, quando comparados aos da decídua entre os dias 9,5 e 10,5 de gestação. O CSF-1 é um fator de crescimento que induz a proliferação *in situ* e a expressão de quimiocinas, tais como CCL2 (MCP-1) em ambos os macrófagos MHCII<sup>lo</sup> e MHCII<sup>hi</sup>. A CCL2 é um sítio de ligação para o receptor de quimiocina CCR2 expresso pelos monócitos sanguíneos Ly6C<sup>hi</sup>. Isto resulta na quimiotaxia de monócitos Ly6C<sup>hi</sup> para o miométrio e sua subsequente diferenciação em macrófagos. Por último, CSF-1 inibe a maturação de macrófagos MHCII<sup>lo</sup> em macrófagos MHCII<sup>hi</sup>. A expansão homeostática de macrófagos MHCII<sup>hi</sup> no miométrio, por sua vez, ocorre pela expansão dos macrófagos MHCII<sup>lo</sup> que maturam (Tagliani *et al.*, 2011). Na decídua, por outro lado, os baixos níveis de



atividade do CSF-1 significam baixas taxas de proliferação de macrófagos *in situ*, baixos níveis de expressão do ligante CCR2, e baixas taxas de quimiotaxia para os monócitos Ly6C<sup>hi</sup>. Assim, a densidade populacional dos macrófagos decíduais reduz quando a decídua aumenta o seu volume com o avançar da gestação. Os macrófagos decíduais são o único tipo celular da decídua que expressa CCL2 (Tagliani *et al.*, 2011), sendo portanto a única fonte de síntese de quimiocina para promover o recrutamento de seus precursores sanguíneos (Tagliani *et al.*, 2011).

Quando se observa a formação de agregados celulares de macrófagos há aumento da quantidade de IL10, principalmente no terço inicial da gestação em humanos (Lidström *et al.*, 2003; Houser *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013a; Zhang *et al.*, 2017), uma citocina com ação anti-inflamatória, sintetizada por eles. A síntese de IL10 está relacionada com a mudança fenotípica de macrófagos M1 para M2, nomenclatura sugerida por Montovani *et al.* (2004) para macrófagos humanos. O fenótipo M1 e M2 diz respeito à forma de ativação e polarização (padrão de expressão de receptores) dos macrófagos (Montovani *et al.*, 2002; Montovani *et al.*, 2004). O fenótipo M1 tem a capacidade de apresentação de antígeno e produção de IL12, IL23, TNF alpha, radicais livres e inicia uma resposta imune do tipo TH1 (Montovani *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2014). O fenótipo M2 está associado ao remodelamento tecidual, promoção da fagocitose de corpúsculos apoptóticos, tem atividade imunossupressora, principalmente por sintetizar grande quantidade de IL10, e estimula a resposta do tipo TH2 mediada por anticorpos (Bulmer *et al.*, 1988; Heikkinen *et al.*, 2003; Montovani *et al.*, 2004; Gustafsson *et al.*, 2008; Erlebacher, 2013a; Brown *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

No terço inicial da gestação em humanos, a decídua é invadida por macrófagos de duas populações fenotipicamente distintas, sendo o CD209 um dos vários marcadores que podem ser usados para sua distinção (Houser *et al.*, 2011; Svensson *et al.*, 2011). A maioria dos macrófagos decíduais são CD209<sup>+</sup> e expressam altos níveis de CD163, CD206 ou receptor de manose (MRC-1), CD304 ou neuropilina-1 (NRP-1) e ICAM-3 e expressam baixos níveis de CD11c (Houser *et al.*, 2011). Em contraste, os macrófagos CD209<sup>-</sup> são CD163<sup>-</sup>, CD206<sup>-</sup>, CD304<sup>-</sup>, ICAM-3<sup>-</sup> e CD11c<sup>hi</sup>, com um perfil próximo ao dos monócitos sanguíneos.

Os macrófagos e as células dendríticas promovem a captura de antígenos presentes no sítio de implantação embrionária, mas também modulam a angiogênese por meio da síntese de fatores de crescimento e quimiocinas, principalmente no terço médio da gestação (Barrientos *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). Entretanto, a função dos macrófagos uterinos ao longo da gestação em murinos é ainda desconhecida. Embora o peso fetal e placentário em camundongos gestantes *Csf1*<sup>op/op</sup>, deficientes em macrófagos, seja normal, há alto índice de perda fetal por razões desconhecidas, mas que pode estar relacionado a falhas na ovulação e na implantação embrionária (Pollard *et al.*, 1991). Camundongos com este fenótipo apresentam número normal de células uNKs, sugerindo que os macrófagos não sejam importantes reguladores das uNKs (Kiso *et al.*, 1992). Entretanto, não há estudos que avaliaram a morfologia das arteríolas espiraladas uterinas, bem como a atividade das células uNKs em camundongos *Csf1*<sup>op/op</sup>. Outro fato importante é que o subtipo MHCII<sup>lo</sup> expressa altos níveis de

LYVE-1, um marcador previamente associado a macrófagos angiogênicos, o que remete a uma ação angiogênica direta (Cho *et al.*, 2007).

Um possível significado fisiológico da baixa densidade de macrófagos decíduais em murinos poderia ser o fato de que os macrófagos são a principal fonte de mediadores inflamatórios que poderiam comprometer o desenvolvimento placentário ou sua função ou, ainda, induzir parto prematuro. Tanto que, elevada densidade de macrófagos decíduais é observada na decídua de mulheres gestantes em pré-eclâmpsia no terço final da gestação (Reister *et al.*, 1999; Lockwood *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Schonkeren *et al.*, 2011). Por outro lado, a expansão homeostática de macrófagos MHCII<sup>hi</sup> nos sítios de implantação em crescimento associada ao aumento da densidade dos macrófagos MHCII<sup>lo</sup> pode ser importante para o crescimento e remodelamento decidual (Bulmer *et al.*, 1988; Heikkinen *et al.*, 2003; Gustafsson *et al.*, 2008; Erlebacher, 2013a). Em consonância com este raciocínio, os macrófagos MHCII<sup>lo</sup> expressam níveis elevados de genes do fenótipo alternativamente ativado (semelhante ao M2) normalmente associados a remodelação tecidual, bem como com a reparação, incluindo CD163, Stab1 (Stabilina-1), e MRC1 (receptor de manose) (Houser *et al.*, 2011; Tagliani *et al.*, 2011). Estas células expressam também LYVE-1 (Cho *et al.*, 2007). Um ponto que ainda permanece obscuro é a participação de macrófagos decíduais MHCII<sup>lo</sup> ou MHCII<sup>hi</sup> na angiogênese ao longo da gestação. Entretanto, macrófagos decíduais expressam elevados níveis de fatores importantes para o remodelamento vascular por promoverem a remoção dos restos celulares apoptóticos provenientes das células musculares lisas que envolvem os vasos e as células endoteliais. Dentre estes fatores já foram descritos a fibronectina, componentes do colágeno, metaloproteinase 9, componentes do complemento C1q e o receptor CD163 (Gustafsson *et al.*, 2008; Hazan *et al.*, 2010; Houser *et al.*, 2011; Svensson *et al.*, 2011).

Processos inflamatórios intrauterinos durante a gestação podem promover a ativação de macrófagos decíduais induzida pela exposição as moléculas dos patógenos. Em gestações de mulheres, observa-se que tanto os partos a termo, quanto os prematuros idiopáticos (sem relação com doenças infecciosas) e infecciosos são associados ao acúmulo de macrófagos decíduais. Este aumento da população de macrófagos, entretanto, não ocorre quando o parto é eletivo, no caso de cesarianas (Hamilton *et al.*, 2012). Outro fato interessante é que a síntese de IL10 pelos macrófagos decíduais, que é intensa no terço inicial da gestação (Lidström *et al.*, 2003; Houser *et al.*, 2011), é drasticamente reduzida no terço final da gestação para que a inflamação decidual ocorra. Portanto, a síntese de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos decíduais no terço final da gestação pode estimular o parto por promover a contração miometrial em murinos, semelhante ao que ocorre em humanos (Romero *et al.*, 2006; Erlebacher, 2013a).

#### **4.3. Células dendríticas (DCs)**

As células dendríticas (DCs – do inglês *dendritic cells*) nos tecidos periféricos são consideradas células sentinelas da resposta imune adaptativa por apresentarem em sua superfície a molécula de MHC II que lhe confere a capacidade de apresentação de antígeno às células efetoras do sistema imunológico (Heikkinen *et al.*, 2003; Kämmerer *et al.*, 2003; Rieger *et al.*, 2004; Plaks *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2009; Tagliani *et al.*, 2009; Erlebacher, 2013a). Quando expostas aos antígenos exógenos e/ou ao estímulo inflamatório, as DCs maturam e passam a expressar

receptores para quimiocinas CCR7, que se ligam ao CCL21, que é a quimiocina que estimula a migração das DCs para os vasos linfáticos (Collins *et al.*, 2009). Esses receptores quando estimulados fazem com que as DCs deixem os tecidos periféricos e migrem via vasos linfáticos para os linfonodos regionais, onde elas apresentam os antígenos às células T sentinelas. Além disso, as DCs podem modular o acúmulo de células T efetoras e sua função no tecido periférico (Barrientos *et al.*, 2009; Erlebacher, 2013a). Dependendo do perfil de citocinas expresso pelas DCs, as células T CD4 se diferenciam em células T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> ou T<sub>H17</sub> (Barrientos *et al.*, 2009; Erlebacher, 2013a).

As funções atribuídas às DCs podem justificar sua escassez no sítio de inserção placentária (Tagliani e Erlebacher, 2011). Em humanos, as DCs mieloides maduras, com fenótipo CD83<sup>+</sup>, estão presentes em secções de decídua no terço inicial da gestação em uma proporção de aproximadamente 1-5 células/mm<sup>2</sup> (Kammerer *et al.*, 2000; Kammerer *et al.*, 2003; Rieger *et al.*, 2004; Kemp *et al.*, 2011). Em murinos, as DCs representam em torno de 10% dos leucócitos na região de decídua na interface materno-fetal. Tem sido descrita sua potencial contribuição para a imunotolerância ao feto semi-halotênico ao longo da gestação. Foi observado que em murinos, o acúmulo das DCs inicia-se por volta do dia 5,5 de gestação até o dia 9,5, mantendo-se constante até o dia 17,5, no sítio de implantação (Blois *et al.*, 2004; Blois *et al.*, 2011). Entretanto, a apresentação do fenótipo maduro das DCs com MHCII<sup>+</sup> reduz neste mesmo período, ou seja, as DCs aumentam em número, mas com baixa capacidade de execução de sua função, como em outros tecidos periféricos, por não apresentarem maturação adequada (Blois *et al.*, 2004).

As DCs CD83<sup>+</sup> também estão presentes no endométrio de humanos durante o ciclo estral e no início da gestação na densidade de aproximadamente 3 células/mm<sup>2</sup> na fase proliferativa e aproximadamente 9 células/mm<sup>2</sup> na fase secretória (Rieger *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que a completa decidualização, por volta do 14<sup>o</sup> DG, está associada com o declínio na densidade DCs CD83<sup>+</sup>. A redução na densidade de DCs durante a decidualização é igualmente evidente no útero de murinos. Ginhoux *et al.* (2009) e Liu *et al.* (2009) identificaram dois tipos de DCs morfológicamente distintos em murinos, um CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>lo</sup> CD103<sup>+</sup>, o qual denominaram de CD11b<sup>lo</sup>, e CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> CD11b<sup>hi</sup> CD103<sup>-</sup>, o qual denominaram CD11b<sup>hi</sup>. Ambos fenótipos são derivados de precursores do compartimento sanguíneo e são visualizados no útero ao longo da gestação (Collins *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). As DCs com capacidade de migração para o linfonodo regional têm o fenótipo F4/80<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> (Collins *et al.*, 2009; Tagliani *et al.*, 2009).

Pelo fato do CD11c ser ubíquo e expresso por outros tipos celulares, tais como eosinófilos (McGarry *et al.*, 1991), células uNKs (Plaks *et al.*, 2008; Millid *et al.*, 2009), macrófagos deciduais MHCII<sup>+</sup> e monócitos deciduais MHCII<sup>+</sup> (Collins *et al.*, 2009), o reconhecimento das DCs, com maior propriedade, só é possível através da citometria de fluxo com o fenótipo de superfície CD11c<sup>hi</sup> MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>neg-int</sup> F4/80<sup>-</sup>. Além disso, o CD11b e o CD103 podem ser usados para distinguir os dois subtipos existentes no endométrio.

Interessantemente, a densidade das DCs se mantém constante no miométrio crescente no início da gestação. Assim, a quimiotaxia de células precursoras das DCs provenientes do

compartimento sanguíneo, bem como a taxa de proliferação das DCs no miométrio ocorre na mesma proporção da taxa de crescimento do miométrio (Collins *et al.*, 2009; Tagliani *et al.*, 2011). A manutenção da baixa densidade de DCs na interface materno-fetal tem papel benéfico quando se pensa em minimizar a imunogenicidade contra os antígenos feto-placentários e, conseqüentemente, reduzir a resposta mediada por células T (Tagliani e Erlebacher, 2011; Erlebacher, 2013a). Um pequeno número de DCs da decídua de camundongos apresenta a capacidade reduzida de migrar para linfáticos, mesmo após sua ativação por estímulo antigênico (Collins *et al.*, 2009). Este achado corrobora com um microambiente decidual de reduzida imunogenicidade na interface materno-fetal. Entretanto, no terço inicial da gestação em humanos, as DCs de fenótipo CD83<sup>+</sup> deciduais possuem capacidade imunoestimulatória para os linfócitos T como foi visto em um cultivo misto destes dois tipos celulares (Kammerer *et al.*, 2000). Além disso, as células DCs mieloides, identificadas como células CD14<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> HLA-DR<sup>Bright</sup> CD11c<sup>+</sup>, sintetizam menor quantidade de IL12 quando comparadas as células precursoras das DCs do compartimento sanguíneo e são mais propensas a estimular a resposta T<sub>H</sub>2 do que T<sub>H</sub>1 dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Miyazaki *et al.*, 2003). Esses resultados sugerem, portanto, que as DCs deciduais podem apresentar antígeno no tecido para as células T CD4<sup>+</sup> de forma a minimizar a resposta T<sub>H</sub>1, o que é mais favorável a manutenção da gestação. Essa teoria pode ser reforçada pelo fato de que leves mudanças na densidade de DCs CD83<sup>+</sup> ocorrem em mulheres com abortos recorrentes e em pré-eclâmpsia (Askelund *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008).

Alguns estudos têm levantado a possibilidade da participação das DCs deciduais no remodelamento decidual semelhante às células uNKs e macrófagos (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008; Barrientos *et al.*, 2009), além da angiogênese. Este fato ocorre porque as células dendríticas sintetizam TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e IL6 que são potentes indutores da síntese de VEGF e seus receptores por outros tipos celulares, inclusive células endoteliais (Barrientos *et al.*, 2009). Além disso, elas também sintetizam fatores angiostáticos, como por exemplo a IL8 e IL12 que reduzem a síntese de VEGF e secretam na ECM fatores que dificultam a ação dos fatores angiogênicos, como a trombospondina (TSP1) e o receptor de reconhecimento de padrões longos pentraxina-3 (PTX3) (Barrientos *et al.*, 2009).

Pesquisas com camundongos transgênicos têm possibilitado evidenciar os efeitos não imunológicos das DCs. Camundongos com células CD11c<sup>+</sup>, incluindo as DCs, expressam o receptor da toxina diftérica de primatas (DTR), que as tornam capazes de passar ilesas pela toxina diftérica (DT). Entretanto, camundongos CD11c<sup>-</sup>DTR, com injeções de DT no período pré-implantação, tanto sistêmica quanto no endométrio, tiveram a decidualização inibida (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008). Essa inibição foi atribuída a falha na multiplicação e diferenciação das células deciduais, o que resultou em falhas no remodelamento decidual e angiogênese reduzida. Esses efeitos foram percebidos inclusive em indivíduos nos quais se induziu a decidualização artificialmente (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008). Como conseqüência, houve perda embrionária e falha no estabelecimento da tolerância imunológica durante a implantação (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008). Transtornos no processo de angiogênese decidual tem sido atribuída à redução do Flt1 solúvel (sFlt1) derivado das DCs, receptor para o VEGFA, por redução da síntese de TGF $\beta$  (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008).

Além disso, cogita-se a hipótese de influência, direta ou indireta, das DCs na diferenciação e sobrevivência das uNKs uma vez que a redução de células DCs CD11c<sup>+</sup> e CD11b<sup>+</sup> ao redor dos vasos é acompanhada pela redução do número e do tamanho das uNKs (Krey *et al.*, 2008; Plaks *et al.*, 2008; Karsten *et al.*, 2009). Cultivos isolados de DCs CD11c<sup>+</sup> mostraram a síntese de IL15 e IL12 que são fundamentais para a diferenciação das uNKs (Karsten *et al.*, 2009). E nestes casos, relatou-se hipocelularidade decidual, defeito no remodelamento arteriolar e baixos níveis de IFN $\gamma$  que são decorrentes da redução da função das uNKs (Croy *et al.*, 2003). Contraditoriamente a esses achados, camundongos geneticamente modificados, com deficiência do fator de crescimento Flt3L, para crescimento e diferenciação das DCs, apresentam redução do número de DCs no útero durante a gestação, mas sem alterações reprodutivas (Tagliani *et al.*, 2011). Além disso, as células uNKs também expressam CD11c, o que poderia interferir com a quantificação de células em camundongos CD11c<sup>-</sup>DTR. A divergência encontrada nestes fatos mantém a ação das DCs na decidualização e angiogênese ainda desconhecida (Tagliani e Erlebacher, 2011).

Os macrófagos deciduais CD209<sup>+</sup> (CD14<sup>+</sup>) também são uma possível fonte de DCs. Isso porque quando esses macrófagos são tratados com uma combinação de citocinas *in vitro*, como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 e PGE2 há geração de células com aumento da expressão de CD83. Este fato é determinante em conferir a esses macrófagos a habilidade de estimular células T para a proliferação em uma reação mista leucocitária semelhante a transformação de monócitos sanguíneos em DCs induzida por citocinas (Kammerer *et al.*, 2003). Entretanto, macrófagos deciduais de humanos não diferenciam em DCs quando tratados com o padrão de citocina IL4/GM-CSF usado para gerar DCs de monócitos sanguíneos. Este fato foi atribuído a síntese de substâncias imunossupressoras na decídua, tais como IL10 e HLA-DR (Heikkinen *et al.*, 2003).

#### **4.4. Células T**

As células T são leucócitos que recebem esta denominação pois se originam e sofrem maturação no timo (T) (Saito *et al.*, 2010). As células T que expressam o co-receptor CD4 (linfócitos T CD4<sup>+</sup>) reconhecem antígenos apresentados em associação ao MHCII. Já as células que expressam o co-receptor CD8 (linfócitos T CD8<sup>+</sup>) reconhecem antígenos ligados ao MHCI (Saito *et al.*, 2010; Erlebacher, 2013a). As células T CD4<sup>+</sup>, por sua vez, estimulam as células B a diferenciarem-se em plasmócitos sintetizando anticorpos, e CD8<sup>+</sup> a diferenciarem-se em linfócitos T citotóxicos que contêm grande quantidade de granzima e perforina (Saito *et al.*, 2010). As células T<sub>H1</sub> sintetizam IFN $\gamma$  e medeiam a imunidade contra patógenos intracelulares. Já as células T<sub>H2</sub> sintetizam IL4 e promovem respostas a alérgenos e parasitas (Mjösberg *et al.*, 2010). As células T<sub>H17</sub>, por sua vez, sintetizam IL17 e medeiam a imunidade contra bactérias extracelulares e fungos (Mjösberg *et al.*, 2010). Além disso, as células T CD4<sup>+</sup> podem assumir um papel regulador imunossupressor por diferenciarem-se em células Treg (do inglês-*regulatory T cells*), as quais expressam o fator de transcrição FOXP3 (Mjösberg *et al.*, 2010; Rowe *et al.*, 2012). As células Treg reduzem as respostas imunes a auto-antígenos e a antígenos exógenos (Mjösberg *et al.*, 2010).

A diferenciação em T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub> e Treg irá depender do perfil de citocinas e quimiocinas sintetizados no local, para o qual os linfócitos T irão se deslocar. As células T<sub>H1</sub> do compartimento sanguíneo são recrutadas por quimiotaxia por CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), e CCL5 (RANTES). Já as células T<sub>H2</sub> são recrutadas por mCCL8, CCL17 e CCL27. As células T<sub>H17</sub>, por sua vez, são recrutadas por CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) e as células Treg são recrutadas por uma grande variedade de quimiocinas, dependendo da localização anatômica (Campbell *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2011; Islan e Luster, 2012). O número total de células T ativadas em um determinado sítio no organismo é determinado pelo nível local de apresentação de antígenos, que controla a sobrevivência das células susceptíveis, além de sua retenção por períodos mais prolongados e as taxas de proliferação *in situ*. Um outro fato interessante é que mediante a resolução de um processo inflamatório, algumas das células T diferenciam-se em células de memória, mantendo-se no organismo por algum tempo, mesmo na ausência de antígenos ou inflamação (Campbell *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2011).

No útero, ao longo da gestação, como foi abordado anteriormente, existem leucócitos e dentre eles uma pequena parte é representada pelas células T. Muito embora todos os fenótipos das células T tenham sido identificados na região da decídua de murinos gestantes, as proporções exatas entre os distintos fenótipos ainda necessitam de mais investigações (Kallikourdis *et al.*, 2007; Nancy *et al.*, 2012; Samstein *et al.*, 2012). Aproximadamente 10-20% dos leucócitos deciduais no terço inicial da gestação em humanos são células T CD3<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, aproximadamente 30-45% dessas células são células T CD4<sup>+</sup> e 45-75% são células T CD8<sup>+</sup> (Bulmer *et al.*, 1991; Tilburgs *et al.*, 2009; Vassiliadou e Bulmer, 1996; Marlin *et al.*, 2011; Mojosberg *et al.*, 2010; Tilburgs *et al.*, 2010; Erlebacher, 2013a, b). Aproximadamente 50% das células T CD4<sup>+</sup> na decídua basal expressam na superfície celular o CD25<sup>dim</sup> que lhe confere a capacidade de ser uma célula de ativação/memória (Tilburgs *et al.*, 2006; Tilburgs *et al.*, 2008; Tilburgs *et al.*, 2010). Considera-se que aproximadamente 40% das células T CD8<sup>+</sup> efetoras mostram um fenótipo efetor/memória CD28<sup>-</sup> (Tilburgs *et al.*, 2010). Cerca de 5% das células T CD4<sup>+</sup> são CD25<sup>bright</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulando as células T (Tregs) com propriedades imunossupressoras (Tilburgs *et al.*, 2008; Mojosberg *et al.*, 2010; Tilburgs *et al.*, 2010). Essas porcentagens mantem-se relativamente constante ao longo da gestação (Tilburgs *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2007; Tilburgs *et al.*, 2010). No que se refere a expressão de receptores de quimiocinas no terço inicial da gestação em humanos, foi observado que os linfócitos T<sub>H2</sub> e T<sub>H17</sub> compreendem aproximadamente 5% e 2%, respectivamente, e os linfócitos T<sub>H1</sub> podem chegar a 30% do total de linfócitos T CD4<sup>+</sup> deciduais (Mojosberg *et al.*, 2010). Linfócitos T  $\gamma\delta$ , linfócitos T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> e células NKT são também encontradas na decídua, mas em número bastante reduzido (Tilburgs *et al.*, 2010). Em camundongos, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> compreendem aproximadamente 3% de todos os leucócitos deciduais no dia 8,5 de gestação (Erlebacher, 2013a).

Interessantemente, observou-se que CXCL9, CXCL10 e CCL5 são expressos por células T na decídua quando associados a quadros inflamatórios. Contudo, em gestações normais os genes que os codificam são epigeneticamente silenciados na decídua (Nancy *et al.*, 2012). Como resultado, as células T<sub>H1</sub> e os linfócitos T citolíticos quando ativados, mesmo contra antígenos placentários, não são capazes de aumentar seu número no estroma decidual (Nancy *et al.*, 2012).

Já o miométrio, entre os sítios de implantação, permanece imunocompetente e expressa quimiocinas induzidas pela inflamação e células T<sub>H1</sub> e pelos linfócitos T citolíticos. O silenciamento dos genes das quimiocinas está associado com o aparecimento da 27 lisina trimetil histona H3 marca repressiva (H3K27me3) em células decíduas (Nancy *et al.*, 2012). Conjuntamente, estes resultados demonstram que a decídua seleciona ativamente os tipos de linfócitos T presentes (Nancy *et al.*, 2012).

As funções exatas das células T encontradas na região de decídua são desconhecidas. O que se sabe é que camundongos deficientes em células T não apresentam falhas reprodutivas, o que ocorre no caso de redução ou ausência das células uNKs, por exemplo. Ao contrário, a presença das células T decíduas, predominantemente linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs), células T<sub>H1</sub> e células T<sub>H17</sub> têm sido correlacionadas com perdas embrionárias, restrição do crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia e redução da proporção de células decíduas Tregs (Sasaki *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Erlebacher, 2013a; Fu *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que as células T<sub>H17</sub> foram detectadas em número reduzido na decídua de camundongos em gestações normais aos 14,5 DG sendo de, aproximadamente, 2-7% do total das células T CD4<sup>+</sup> decíduas (Fu *et al.*, 2013). Entretanto, em pacientes que apresentaram quadros de aborto espontâneo recorrente tiveram elevada proporção de células decíduas T<sub>H17</sub> e inflamação local quando o endométrio foi avaliado a histologia (Nakashima *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013). Além disso, verificou-se que fêmeas Nfil3<sup>-/-</sup> (sem células NKs) quando acasaladas com machos de linhagem diferente apresentaram gestação propensa a abortos espontâneos, o que foi relacionado ao aumento da população de células T<sub>H17</sub> e exuberante inflamação associadas a ausência das células uNKs (Fu *et al.*, 2013). A reação inflamatória local, por sua vez, afeta ainda mais a função reguladora das células uNKs o que reduz a capacidade imunotolerante na interface materno-fetal, tão necessária para o sucesso da gestação. Desta forma, pôde-se estabelecer uma reação reguladora para a uNK no que se refere a supressão da atividade das células T<sub>H17</sub>. Sendo assim, as células uNKs CD56<sup>bright</sup>CD27<sup>+</sup> também são responsáveis por promoverem a tolerância imunológica durante a gestação por reduzir as células T<sub>H17</sub> por meio da síntese de IFN $\gamma$  (Fu *et al.*, 2013).

Além disso, outros estudos evidenciaram que existe aumento da razão decidual T<sub>H1</sub>/T<sub>H2</sub> associado a quadros de aborto recorrente (Piccinni *et al.*, 1998; Redline, 2007; Edmondson *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2010). Um aumento das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> tem sido relatado em quadros patológicos inflamatórios com alterações histológicas da interface materno-fetal como deciduíte crônica, que afeta a decídua basal, corioamnionite crônica, que afeta as membranas coriônicas e vitilite de etiologia desconhecida, que afeta a placenta, mas com frequente envolvimento da decídua (Redline, 2007; Edmondson *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Essas alterações histológicas são observadas em aproximadamente 10-20% das gestações clinicamente normal, sendo mais frequentes no caso de parto prematuro e crescimento intrauterino retardado.

Por outro lado, às células Treg são atribuídas a função de imunossupressão na interface materno-fetal. Isso ocorre porque estas células estão relacionadas a supressão da ação das células T<sub>H1</sub> e CTL contra antígenos feto-placentários (Kallikourdis *et al.*, 2007; Rowe *et al.*,

2011, 2012). Grande quantidade de células Treg maternas são encontradas no lúmen uterino durante a gestação. Um estudo em camundongos revelou que no dia 10,5 de gestação as células Treg correspondem a mais de 70% do total das células T CD4<sup>+</sup> (Rowe *et al.*, 2012). Um estudo demonstrou que camundongos transgênicos, tratados com toxina diftérica, sofrem a perda de células Treg Foxp3<sup>+</sup> e quando gestantes possuem alta taxa de reabsorção fetal, mas menor suscetibilidade a infecção por patógenos como *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. (Rowe *et al.*, 2011). O contrário ocorre em indivíduos nos quais existe o aumento de células Treg Foxp3<sup>+</sup> e que, por ocasião da gestação, mantiveram a tolerância imunológica ao feto, contudo desenvolveram maior suscetibilidade às infecções uterinas (Rowe *et al.*, 2011). Outro fato que corrobora com a função das células T na tolerância materna ao feto semi-alogênico é que o cultivo de células T provenientes do sítio de implantação de fetos abortados têm a redução da secreção de IFN $\gamma$  quando cocultivadas com células T provenientes de sítios de implantação normais (Zenclussen *et al.*, 2005). Outro fato interessante observado foi que as células Treg CCR5<sup>+</sup>, um receptor de quimiocina que se liga a CCL5, possuem atividade imunossupressora mais elevada do que as células Treg CCR5<sup>-</sup>. Além disso, uma proporção maior de células Treg CCR5<sup>+</sup>/Treg CCR5<sup>-</sup> mostrou ser condição necessária para que não haja reabsorção embrionária (Kallikourdis *et al.*, 2007). Desta forma, conclui-se que o aumento de células Treg na decídua e no lúmen uterino é essencial para a tolerância imunológica ao feto em desenvolvimento. Entretanto, gera falhas imunológicas tão severas que tornam esses indivíduos susceptíveis às infecções (Rowe *et al.*, 2011).

#### **4.5. Células B**

Os linfócitos B são conhecidos por fazerem parte do sistema imune adaptativo e por possuírem elevada capacidade de síntese e secreção de anticorpos. Os anticorpos ou imunoglobulinas (Igs) podem estar na superfície dos linfócitos B ou serem exocitados. As Igs reconhecem antígenos, exógenos ou autógenos, com excepcional especificidade. Ao lado de seu papel essencial na imunidade humoral, as células B regulam muitas outras funções que são importantes para a homeostase imune. Elas contribuem para a regulação, desenvolvimento e ativação dos tecidos linfóides do organismo e sintetizam citocinas, que por sua vez, regulam a função das DCs e das células T (Porakishvili *et al.*, 2001; Youinou *et al.*, 2005; LeBien e Tedder, 2008; Muzzio *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2014). As células B na gestação podem atuar tanto de forma benéfica quanto de forma maléfica dependendo do padrão de Igs que expressam (Muzzio *et al.*, 2013).

Basicamente, as células B podem ser divididas em duas principais populações, as células B1 e B2. Estas duas populações diferem quanto à origem de seu desenvolvimento, expressão de marcadores de superfície e função (LeBien e Tedder, 2008). As células B1 são subdivididas ainda em células B1a, CD5<sup>+</sup>, e B1b, CD5<sup>-</sup>, baseada na expressão do marcador de superfície CD5 (Kantor *et al.*, 1992; LeBien e Tedder, 2008). As células B1a sintetizam um tipo específico de anticorpo denominado anticorpo natural (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2006). Devido a sua natureza de reatividade inespecífica, os anticorpos naturais têm sido relacionados com a indução de doenças autoimunes (Duan e Morel, 2006). Durante a gestação, as várias subpopulações de células B são encontradas na região da decídua em humanos e murinos. Os diferentes tipos de células B podem atuar de forma igualmente diferenciada na interface



materno-fetal podendo favorecer ou prejudicar o desenvolvimento fetal (Muzzio *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2014). Assim, têm anticorpos que são considerados protetores por promoverem efeitos benéficos ao longo da gestação, e em contrapartida, existem os auto-anticorpos que têm sido relacionados a complicações gestacionais (Muzzio *et al.*, 2013).

Mesmo durante a gestação, as células B1a produzem anticorpos naturais que têm sido relacionados com efeitos deletérios. Pesquisadores demonstraram que existe redução significativa do número de células B1a na decídua de mulheres, no terço final de gestações normais. Entretanto, em mulheres que apresentam o quadro clínico de pré-eclâmpsia, o número de células B1a, fenótipo CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>, mantêm-se elevado ao final da gestação (Jensen *et al.*, 2012). A manutenção do número elevado de linfócitos B1a na interface materno-fetal em mulheres com pré-eclâmpsia tem sido atribuída aos altos níveis de gonadotrofina coriônica humana (hCG), o que não é normal ao final da gestação. A hCG age nos linfócitos B1a porque essas células expressam receptores LH/CG. Além disso, um estudo realizado com cultivo de células B1a de humanos acrescido de hCG demonstrou expansão dessas células (Jensen *et al.*, 2012). Contudo, em murinos o hCG inibiu a formação de anticorpo pelas células B (Nikolaevich *et al.*, 1991). Os estudos em murinos avaliaram somente o total de células B não fazendo distinção entre os subtipos o que pode ter causado a divergência de resultados. Um outro estudo que reforçou a ação das células B na patogênese da pré-eclâmpsia foi um modelo criado em murinos mimetizando essa doença. Observou-se que a depleção de células B1a nos camundongos com pré-eclâmpsia correlacionou-se com um nível mais baixo de anticorpos AT1-AA (receptor tipo I para autoanticorpo de angiotensina II), o que reduziu os sintomas da pré-eclâmpsia nesses indivíduos (LaMarca *et al.*, 2011).

## **5. Mudanças vasculares na decídua**

### **5.1. Mudança da morfologia vascular**

O crescimento fetal adequado requer um suprimento sanguíneo com consequente troca satisfatória de nutrientes e metabólitos na interface materno-fetal. Para que isso ocorra é fundamental que haja adaptações e um aprimoramento no sistema vascular uterino (Pijnenborg *et al.*, 1983; Charnock-Jones *et al.*, 2001; Huppertz e Peeters, 2005; Bazer *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). Essas mudanças morfológicas na vascularização dos sítios de implantação embrionária são mais intensas em espécies animais com placentação do tipo hemocorial como murinos, primatas humanos e não humanos, apesar de ocorrer em todas os tipos de placentação (Charnock-Jones *et al.*, 2001; Bazer *et al.*, 2009). O desenvolvimento e a formação dos vasos durante a gestação ocorrem por dois processos, a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir de células precursoras que se diferenciam em células endoteliais e formam uma nova rede vascular. Esta forma de desenvolvimento vascular é importante durante a organogênese fetal e início do desenvolvimento placentário (Tayade *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). A angiogênese, por sua vez, é a formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes por prolongamento vascular, intussuscepção ou proliferação de células endoteliais. Este processo envolve múltiplas etapas como ativação e proliferação das células endoteliais, degradação de sua membrana basal, migração através da matriz extracelular, atração de células musculares lisas e maturação dos

vasos (Zygmunt *et al.*, 2003; Plaisier, 2011). Falhas nestes processos cursam com patologias gestacionais como pré-eclâmpsia, crescimento intrauterino retardado e natimortalidade (Coulam, 2000; Malassiné *et al.*, 2003; Toder *et al.*, 2003; Torry *et al.*, 2004; Redmer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012).

As mudanças morfológicas e funcionais na vascularização da interface materno fetal ocorrem por uma série de eventos sendo regulada, principalmente, pelos níveis de oxigênio na região, bem como pela expressão de diferentes fatores de crescimento, angiogênicos e citocinas (Geva *et al.*, 2002; Charnock-Jones *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2007; Tayade *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). Na verdade, os baixos níveis de oxigênio detectados na região de decídua no terço inicial da gestação é o fator desencadeante da adaptação vascular com consequente aumento do diâmetro dos vasos (Zhang *et al.*, 2002). Existem mais estudos descrevendo as adaptações vasculares que ocorrem na placenta do que na decídua ao longo da gestação (Plaisier, 2011). Indivíduos com placenta do tipo hemocorial apresentam diferenciação do endométrio tornando este secretório, de forma difusa. Já no sítio de implantação embrionária existe a modificação da estrutura do tecido endometrial denominada decídua mesometrial e antimesometrial. Tanto a diferenciação endometrial quanto a decidualização é acompanhada de mudanças na vasculatura (Maglione *et al.*, 1991; Charnock-Jones *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995; Vuorela *et al.*, 1997; Shore *et al.*, 1997; Bazer *et al.*, 2009). O endométrio secretório contém pequenos e múltiplos vasos, enquanto que a vasculatura da decídua mesometrial é constituída de vasos largos em pequeno número, sustentados por tecido conjuntivo frouxo. Na decídua basal, a densidade vascular é reduzida em relação à glândula metrial. Contudo, suas características morfológicas permitem maior superfície luminal, maior fluxo sanguíneo local e maior permeabilidade vascular, o que facilita a troca de nutrientes e metabólitos (Charnock-Jones, 2002; Huppertz e Peeters, 2005; Plaisier *et al.*, 2007). Posteriormente, os vasos da decídua são invadidos por inúmeros trofoblastos extravilosos possibilitando maior aproveitamento dos nutrientes maternos pelo feto (Charnock-Jones, 2002; Huppertz e Peeters, 2005). O aumento do diâmetro vascular na decídua provavelmente está relacionado ao aumento do suprimento sanguíneo requerido para suprir a demanda metabólica do feto em desenvolvimento (Gibbons e Dzau, 1994; Kam *et al.*, 1999).

### **5.2. Remodelamento da artéria espiralada**

As mudanças vasculares uterinas têm início com a ação do estrógeno, proveniente do pico pré-ovulatório, e da progesterona, sintetizada pelo corpo lúteo. Contudo, é com o estímulo de fatores liberados pelas células deciduais, células imunes e trofoblásticas, na interface materno-fetal, que ocorrem mudanças mais significativas, marcadas pela angiogênese, vasculogênese e remodelamento vascular (Ramathal *et al.*, 2010). O remodelamento vascular na decídua ocorre com o objetivo de promover vasodilatação, maior fluxo sanguíneo para a placenta e aumento da permeabilidade vascular, indispensável para a nutrição adequada do feto (Adamson *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2005; Plaisier *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). Portanto, o remodelamento vascular vai ocorrer, principalmente, no terço médio da gestação, quando já houve o aumento das ramificações e da complexidade da rede vascular e há maior demanda fetal. Para que ele ocorra de forma adequada existe a ação conjunta de enzimas da família das

metaloproteinases (MMPs) e das integrinas, além de fatores de crescimento e angiogênicos (Huppertz e Peeters, 2005; Ong *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007).

O remodelamento vascular é caracterizado pela mudança estrutural das artérias espiraladas uterinas que sofrem desorganização e perda de sua musculatura lisa, sendo substituída por fibrina e elastina (Pijnenborg, 1998; Kam *et al.*, 1999). Os vasos sanguíneos perdem também o revestimento de células endoteliais, sendo substituídas pelas células trofoblásticas extravilosas (Pijnenborg, 1998; Kam *et al.*, 1999; Adamson *et al.*, 2002; Zygmunt *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2004; Huppertz e Peeters, 2005; Ong *et al.*, 2005; Harris e Aplin, 2007; Plaisier *et al.*, 2007; Osol e Mandala, 2009; Pijnenborg *et al.*, 2011; Plaisier, 2011). Esse processo reduz a resistência e promove a dilatação ao longo da gestação propiciando maior permeabilidade vascular e maior aporte nutricional ao feto. Morfologicamente, o resultado que se tem é a artéria radial dando origem a uma estrutura com ramificações de artérias espiraladas, denominadas artérias espiraladas uterinas, que se anastomosam quando chegam à decídua basal e placenta (Adamson *et al.*, 2002).

As células uNKs, macrófagos e trofoblastos intersticiais são fundamentais no processo de remodelamento vascular, principalmente promovendo a migração dos trofoblastos para o interior dos vasos, bem como na sua organização para o revestimento interno do mesmo (Adamson *et al.*, 2002; Huppertz e Peeters, 2005; Hanna *et al.*, 2006; Lash *et al.*, 2006; Dunk *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009). Na pré-eclâmpsia, patologia gestacional na qual a invasão endovascular pelos trofoblastos é muito superficial, não há expressão dos fatores endoteliais na superfície trofoblástica, como a  $\alpha V\beta 3$  e a caderina VE (Zhou *et al.*, 1997). Sendo assim, os trofoblastos extravilosos permanecem com fenótipo de aderência não conseguindo alcançar o lúmen dos vasos sanguíneos em uma proporção adequada (Zhou *et al.*, 1997). Durante a invasão trofoblástica dos vasos sanguíneos da decídua há também a morte por apoptose das células endoteliais e dos leiomiócitos da parede vascular. Essa morte se dá pela ação direta de fatores apoptóticos ou indiretamente, estimulando a perda de adesão celular. Isto é seguido por dilatação arterial e hiperemia ativa (Pijnenborg *et al.*, 1983; Harris, 2010; Whitley e Cartwright, 2010).

O que se vê na região de decídua basal é uma estrutura contendo em torno de 100 à 150 artérias em mulheres gestantes, sendo que todas sofrem o processo de remodelamento. Contudo, as artérias espiraladas da região central da placenta sofrem mais intensamente o efeito do remodelamento do que as artérias da periferia (Lyall, 2005; Plaisier, 2011). Em murinos, cada artéria radial que carrega sangue para o útero gestante ramifica-se em 5 à 10 artérias, de formato espiral, que se dilatam à medida que se aproximam da placenta (Adamson *et al.*, 2002). O diâmetro das artérias espiraladas é sempre maior do que os da artéria radial. Essas artérias espiraladas encontram-se dentro do triângulo metrial e são rodeadas por uNKs, chegando até a decídua basal. As artérias espiraladas convergem quando chegam à camada de células trofoblásticas onde despejam o sangue em canais recobertos por trofoblastos que carregam o sangue para a base da placenta. O sangue materno segue um fluxo no labirinto placentário que é contracorrente ao sentido do fluxo sanguíneo capilar fetal, o que facilita a troca de nutrientes e metabólitos. A dilatação das artérias espiraladas torna-se mais evidente entre os dias 10,5 e 14,5

de gestação em camundongos, sendo associada a redução intensa ou ausência de leiomiócitos (Adamson *et al.*, 2002).

Além disso, as veias que compõem a região da decídua também parecem passar pelo processo de remodelamento. Em um estudo da histologia da decídua em mulheres gestantes observou-se que as veias se tornam dilatadas e há depósitos de fibrina associados a locais de invasão de trofoblastos (Craven *et al.*, 2002). O resultado final do processo de remodelamento vascular é um microambiente vascular de baixa resistência arteriolar com aspecto sacular dos vasos, que não responde ao controle vasomotor materno. A falta de auto-regulação do fluxo sanguíneo placentário permite um extremo aumento no aporte sanguíneo necessário para atender às demandas crescentes do feto (Brosens *et al.*, 1967; Greiss *et al.*, 1976). Além disso, uma autonomia da rede vascular na interface materno-fetal a torna menos vulnerável às tensões e à fisiologia materna.

O remodelamento decidual e vascular ocorre em resposta à demanda metabólica fetal crescente (Guillomot, 1999; Fazleabas *et al.*, 2004; Plaisier, 2011). Para que estes processos ocorram, células da decídua, trofoblásticas e leucócitos expressam proteases e inibidores das proteases e entre elas há um ténue equilíbrio. As MMPs são expressas no endométrio e em células trofoblásticas durante a implantação (Waterhouse *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1996; Fazleabas *et al.*, 2004). A ação das MMPs e das integrinas é promover a degradação da matriz do estroma uterino, permitindo a migração das células trofoblásticas através da decídua e sua penetração nos vasos sanguíneos (Waterhouse *et al.*, 1993; Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001; Fazleabas *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). A atividade das MMPs é modulada por fatores de crescimento, citocinas, plasmina e hormônios esteroides. As MMPs tipo membrana (MT-MMP) 1, 2 e 3 são conhecidas por induzir a angiogênese e a MT-MMP1 promove a migração celular, angiogênese e a metástase tumoral (Plaisier, 2011). O remodelamento caracteriza-se por aumento da espessura vascular, uma vez que o diâmetro médio arterial passa de 60µm aos 10,5 dias para 150µm aos 14,5 DG em camundongos. E, neste período, não há mais aumento significativo do número de vasos (Adamson *et al.*, 2002).

Na região de decídua há predomínio da expressão de MMP3 em humanos e primatas não humanos (Salamonsen *et al.*, 2003; Fazleabas *et al.*, 2004). As MMPs degradam a matriz extracelular, as fibrilas e a membrana basal para que as células trofoblásticas se desloquem na decídua (Salamonsen *et al.*, 2003). Sua ação é controlada pelos inibidores de MMPs (TIMPs) que também são expressos no endométrio e em células trofoblásticas durante a implantação (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). A degradação da ECM gera peptídeos que promovem sinalização através de receptores de membrana celular ocasionando reorganização do citoesqueleto das células em decidualização (Fazleabas *et al.*, 2004). Há uma hipótese de que a IL1 seja responsável pelo aumento de MMP-3 no estroma endometrial em decidualização (Fazleabas *et al.*, 2004).

A expressão das TIMPs aumenta bastante durante a decidualização imediatamente ao redor do sítio de implantação do embrião em murinos (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). Esta expressão é maior nas áreas de implantação do que nas áreas inter-implantação, ou seja, não decidualizadas, e em útero com indução artificial da decidualização (Bany e Schultz, 2001).

Este fato sugere fortemente que as TIMPs são requeridas para limitar a invasão das células trofoblásticas, inibindo a atividade da MMP9 (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). Outro fato que corrobora com esta teoria é que a inibição das MMPs endometriais usando TIMPs reduz a extensão e o tamanho da área decidualizada tanto em camundongos (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001) quanto em ratas (Rechtman *et al.*, 1999; Bany e Schultz, 2001).

Os diferentes tipos de TIMPs são expressos na decídua de forma diferenciada. Os TIMP1 e 2 estão localizado na zona decidual secundária nos dias 6-8 de gestação em camundongos (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). O TIMP3, por outro lado, está localizado na zona decidual primária e na decídua mesometrial (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). Enquanto que o TIMP2 tem os níveis crescentes ao longo da gestação, o TIMP1 tem a sua expressão máxima na decídua entre os dias 7-11 de gestação em camundongos (Waterhouse *et al.*, 1993). O TIMP 3 tem aumento transitório entre os dias 6-8 de gestação em murinos (Alexander *et al.*, 1996; Bany e Schultz, 2001). Um outro fato interessante é que células do estroma endometrial de camundongos decidualizadas quando cultivadas sobre efeito do TGF $\beta$ 1 aumentam a expressão gênica de TIMPs 1 e 3. Entretanto, quando esse mesmo tipo celular é cultivado em meio contendo IL1, EGF e LIF não há alteração da expressão gênica de TIMPs 1 e 3. Sendo assim, o TGF $\beta$ 1 é inferido como um dos moduladores da expressão de TIMPs durante a decidualização (Bany e Schultz, 2001).

A proteína convertase 6 (PC6), que promove proteólise seletiva, tem sua expressão aumentada nos sítios de implantação no camundongo por volta dos dias 4,5-5,5 de gestação e em decídua, reduzindo após o dia 6,5 de gestação. As PCs quebram polipeptídeos precursores em peptídeos e proteínas ativas. Dentre os objetos de sua ação tem-se as integrinas, membros da superfamília TGF $\beta$ , pró-IGF1 e 2 e pró-EGFs. O receptor para EGF tem sido indicado como essencial para a proliferação estromal uterina e decidualização em roedores (Hom *et al.*, 1998; Dai e Ogle, 1999). A PC6 é expressa em associação com a decidualização em humanos e postula-se que ela tenha papel chave na preparação do endométrio para a gestação em humanos (Salamonsen *et al.*, 2003).

### **5.3. Controle da vascularização**

Durante a gestação, em primatas humanos e não humanos e murinos, o controle das mudanças morfológicas da vascularização na interface materno-fetal tem início na ausência de células trofoblásticas e progride mais rapidamente com a chegada dessas células à decídua basal (Craven *et al.*, 1998; Pijnenborg *et al.*, 2006; Kam *et al.*, 1999). Tanto os hormônios da gestação quanto os trofoblastos extravilosos induzem as alterações vasculares durante o remodelamento decidual. Além disso, as células uNKs estão envolvidas na modulação das alterações vasculares na região de decídua do sítio de implantação (Plaisier *et al.*, 2007; Plaisier *et al.*, 2008). As modificações vasculares têm início no começo da gestação e vão até o início do terço médio da gestação em murinos, a partir do qual promove-se a maturação dos vasos e o crescimento reduzido. A expressão diferencial dos fatores angiogênicos em vários tipos celulares deciduais e da glândula metrial durante a gestação indica o envolvimento destas células na regulação da

angiogênese e no remodelamento vascular (Dunk *et al.*, 2008; Plaisier, 2011; Vasilopoulou *et al.*, 2014).

Os fatores que estão envolvidos na angiogênese e na vasculogênese mais estudados são o VEGF A, PlGF, a família das angiopoietinas (Ang), seus receptores Flk1 e Tie-2 e proteases (Sherer e Abulafia, 2001; Plaisier *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2007; Plaisier, 2011, Seidenspinner *et al.*, 2011), além da hipóxia gerando o estresse oxidativo (Adelman *et al.*, 2000; Red-Horse *et al.*, 2004). Esses fatores de crescimento e seus receptores são modulados por vários outros fatores como os hormônios esteroides, células decíduais, células imunes e trofoblastos extravilosos (Zygmunt *et al.*, 2003; Plaisier, 2011). Alterações na expressão de qualquer um destes fatores são causas de patologias gestacionais em mulheres e modelos animais experimentais como pré-eclâmpsia, crescimento intrauterino retardado e aborto (Coulam, 2000; Malassiné *et al.*, 2003; Toder *et al.*, 2003; Torry *et al.*, 2004; Redmer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012).

#### 5.4. Oxigênio

A interface materno-fetal é altamente influenciada pela tensão de oxigênio sendo muito sensível a tênues modificações (Genbacev *et al.*, 1996; Kingdom e Kaufmann, 1997; Li *et al.*, 2005; Rosario *et al.*, 2008). A tensão de oxigênio modula a proliferação e/ou a diferenciação das células tanto na decídua quanto na placenta, por meio, principalmente, da ação do fator indutor de hipóxia 1 (HIF1) (Adelman *et al.*, 2000). O HIF1 é um fator de transcrição heterodimérico proteico e possui o translocador nuclear do receptor de aril hidrocarbono (ARNT) como seu receptor (Adelman *et al.*, 2000). Tanto o excesso quanto a falta de oxigênio podem afetar a expressão de VEGF e seus receptores de forma diferenciada. Isso ocorre porque sob condições de hipóxia, tanto na decídua quanto na placenta, o HIF1 é estabilizado e aumenta a síntese de VEGF (Adelman *et al.*, 2000; Shibuya, 2008). As alterações mediadas pela hipóxia na família do VEGF têm sido correlacionadas com a patogênese de patologias gestacionais como a pré-eclâmpsia e o crescimento intrauterino retardado (Kaliq *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2000). A hipóxia induz o aumento da síntese de VEGF e reduz a expressão de PlGF pelas células trofoblásticas (Kaliq *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 2003). Além disso, a hipóxia também induz o estresse oxidativo na interface materno-fetal e modula a função trofoblástica (Li *et al.*, 2005). Isso foi evidenciado pelo fato de que células trofoblásticas, cultivadas sob condições de hipóxia, aumentam a expressão de VEGF e Flt1 solúvel tendo, este último, sido correlacionado com o aumento da síntese de peróxido lipídico, além de proliferarem mais (Adelman *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005). Entretanto, citotrofoblastos cultivados em alta tensão de oxigênio aumentam a sua diferenciação (Adelman *et al.*, 2000). Estes fatos permitem a conclusão de que a hipóxia regula o processo da angiogênese e da vasculogênese na interface materno-fetal, promovendo a proliferação celular, enquanto que o aumento da tensão de oxigênio permite a diferenciação das células.

A circulação sanguínea na interface materno-fetal em humanos é marcada por um fluxo lento antes da oitava semana de gestação. Este fato ocorre por obstruções temporárias das artérias. A circulação sanguínea normal é reestabelecida gradualmente pela dissolução dos coágulos (Burton *et al.*, 1999; Jauniaux *et al.*, 2000). Devido a este fato a placenta em humanos se

desenvolve em um ambiente de baixa tensão de oxigênio durante a maior parte do terço inicial da gestação. Isto pode proteger o embrião de um forte fluxo sanguíneo materno e excesso de oxigênio que não seriam adequados para a proliferação de suas células (Kingdom e Kaufmann, 1997; Burton *et al.*, 1999; Jauniaux *et al.*, 2000). Isso porque o grande aporte de oxigênio poderia gerar um estresse oxidativo com consequente aumento de radicais livres e outras substâncias tóxicas no local (Jauniaux *et al.*, 2000; Charnock-Jones *et al.*, 2004; Burton, 2009). Em humanos, a alteração mais intensa no nível de oxigênio está nos intervalos placentários, entre a 9ª e 12ª semana de gestação. Entretanto, a decídua basal mostra um aumento no nível de oxigênio neste período, mesmo que sutil quando comparado a períodos posteriores (Jauniaux *et al.*, 2000).

O aumento do estresse oxidativo tem uma função fisiológica importante na placenta normal e no desenvolvimento decidual por estimular a secreção de fatores angiogênicos e por regular o remodelamento das vilosidades coriônicas e da invasão de trofoblastos no início da gestação (Jauniaux *et al.*, 2000; Sharkey *et al.*, 2000; Charnock-Jones *et al.*, 2004). Contudo, ao final da gestação tem sido discutido o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da pré-eclâmpsia. Isso porque um estudo revelou que mulheres que apresentam o quadro de pré-eclâmpsia ao final da gestação possuem níveis de pró-oxidantes e peroxidação lipídica mais elevados do que mulheres com gestações normais, bem como a redução de anti-oxidantes (Rani *et al.*, 2010).

### 5.5. VEGF-A

O controle do crescimento vascular na interface materno-fetal se dá por diversas formas fisiológicas e patológicas, que alcançam o objetivo de um balanço delicado entre estímulos positivos e negativos (Charnock-Jones *et al.*, 2001). Um dos mais potentes estimuladores da angiogênese na interface materno-fetal, em todas as espécies de animais domésticos e no homem, é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Charnock-Jones *et al.*, 2001; Ferrara, 2004; Zacharek *et al.*, 2007; Douglas *et al.*, 2009; Plaisier *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Andraweera *et al.*, 2012). Isso porque ele modula a proliferação e a apoptose das células endoteliais, bem como sua migração e o aumento da permeabilidade vascular (Ferrara, 2004; Plaisier, 2011).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica que possui cinco isoformas contendo 121, 145, 165, 189 ou 206 aminoácidos em cada monômero (Houck *et al.*, 1991; Charnock-Jones *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 2000). O VEGF tem importância na angiogênese em diferentes tecidos, inclusive no sistema reprodutivo, como endométrio (Charnock-Jones *et al.*, 1993; Torry *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2011), ovário (Philips *et al.*, 1990) e no embrião (Jakeman *et al.*, 1993). Além disso, outros estudos demonstraram que o VEGF é altamente expresso pela decídua e placenta em humanos (Sharkey *et al.*, 1993; Charnock-Jones *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 1994; Plaisier *et al.*, 2007) e murinos (Srivastava *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 2009; Douglas *et al.*, 2014) e no epitélio das glândulas endometriais e trofoblástico em suínos (Tayade *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011). Portanto, o VEGF é um dos primeiros fatores ativados durante o período de pré-implantação embrionária relacionado a angiogênese placentária e decidual (Krussel *et al.*, 2003).

A ação do VEGF ocorre pela sua ligação a um de seus receptores tirosina quinase que são o VEGFR1 ou Flt-1, e o VEGFR2 ou KDR/Flk1 (Luttun *et al.*, 2002; Ferrara, 2004; Zacharek *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). Os reguladores da expressão de VEGF A são a hipóxia, o E2, a P4 e os receptores VEGFR 1 e VEGFR 2 (Ahmed *et al.*, 2000; Shibuya, 2008; Plaisier, 2011). Existe uma ação sinérgica entre o VEGF e o PlGF, outro potente fator angiogênico, entretanto o PlGF está envolvido mais efetivamente com a maturação vascular enquanto que o VEGF promove a proliferação dos vasos (Luttun *et al.*, 2002; Plaisier, 2011). A importância do VEGF e dos seus receptores durante o desenvolvimento vascular foi evidenciada em camundongos transgênicos. Isso porque a supressão de um único alelo do VEGF resultou em desenvolvimento anormal da vasculatura e morte embrionária no terço médio da gestação. Além disso, as mutações em seus receptores, VEGFR1 ou VEGFR2, também resultaram em falhas no desenvolvimento da vasculatura (Fong *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996).

O blastocisto humano sintetiza quantidades significativas de VEGF-A, por meio do qual é capaz de estimular a angiogênese (Shore *et al.*, 1997; Kapiteijn *et al.*, 2006). Diversos estudos relataram a expressão do VEGF-A e dos seus receptores no terço inicial da gestação em diversos tipos celulares da decídua basal e parietal em humanos, incluindo células endoteliais, células epiteliais, macrófagos e trofoblastos intersticiais (Cooper *et al.*, 1995; Plaisier *et al.*, 2007). Além disso, o VEGF-A estimula a proliferação e a invasão de células trofoblásticas (Charnock-Jones *et al.*, 1994). As células uNKs presentes na decídua são grandes produtoras de VEGF, principalmente entre os dias 7 e 13 de gestação em murinos (Wang *et al.*, 2000). Portanto, o VEGF-A desempenha papel ativo na angiogênese e na invasão trofoblástica durante o período de implantação (Cooper *et al.*, 1995; Plaisier *et al.*, 2007).

### **5.6. PlGF**

O fator de crescimento placentário (PlGF) pertence a super-família do VEGF e age sinergicamente com o VEGF-A na interface materno-fetal (Ahmed *et al.*, 2000). O PlGF é uma proteína de 149 aminoácidos e tem 53% de homologia com o VEGF (Maglione *et al.*, 1991), sendo expresso por sinciotrofoblastos (Shore *et al.*, 1997; Vuorela *et al.*, 1997) e grandes vasos da placenta em humanos (Khaliq *et al.*, 1996). O PlGF, assim como o VEGF, age por meio da ligação aos receptores tirosina quinase presentes nas células-alvo (Khaliq *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2000; Luttun *et al.*, 2002; Ferrara, 2004; Zacharek *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). A expressão gênica de PlGF, bem como de suas proteínas foram detectadas em células endoteliais, trofoblásticas e células do estroma decidual (Khaliq *et al.*, 1996; Plaisier *et al.*, 2007), sendo que as proteínas do PlGF e Flt-1 encontram-se, predominantemente, em células endoteliais (Plaisier *et al.*, 2007).

O efeito do PlGF sozinho não é muito evidente. Contudo, ele potencializa o efeito do VEGF quando associado sobre as células endoteliais da microvasculatura, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Park *et al.*, 1994). Essa, inclusive, pode ser uma explicação do porquê do PlGF se ligar ao Flt-1 e não ao KDR (Park *et al.*, 1994). A expressão de PlGF e Flt-1 aumenta do terço médio para o final da gestação em humanos (Clark *et al.*, 1996). A ação envolve a formação dos longos e pouco ramificados capilares terminais no terço final da gestação. Essa possivelmente é a razão pela qual o PlGF é responsável pela formação de uma rede de vasos e sua maturação e



estabilidade. Pois é neste período, terço médio e final da gestação, que a rede vascular está praticamente formada e precisa de estabilidade para suportar o aumento do fluxo sanguíneo (Ahmed *et al.*, 2000). Essas características são fundamentais para permitir a resistência tecidual ao intenso aumento do fluxo sanguíneo no sítio de implantação, que ocorre no terço médio da gestação, em resposta ao aumento das demandas metabólicas do feto em crescimento (Khaliq *et al.*, 1996; Torry *et al.*, 1999; Carmeliet *et al.*, 2001; Luttun *et al.*, 2001).

### 5.7. Angiopoietinas

As angiopoietinas 1 e 2 (Ang-1 e Ang-2) e o seu receptor tirosina quinase (Tie-2) também regulam a angiogênese (Wulff *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2003; Zygmunt *et al.*, 2003; Plaisier, 2011). O seu envolvimento se dá principalmente no processo de vasculogênese (Zygmunt *et al.*, 2003). Mutações nos genes das Ang-1 ou Ang-2 resultam em morte embrionária no início da gestação, demonstrando papel essencial para as angiopoietinas em camundongos geneticamente modificados (Suri *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997). Ang-1 e -2 e Tie-2 foram detectados em vários tipos celulares da decídua de mulheres gestantes no terço inicial da gestação. O Tie-2 foi encontrado, principalmente, em células endoteliais maternas, trofoblastos endovasculares e citotrofoblastos. Já as Ang-1 e -2 foram observadas principalmente no citotrofoblasto (Zhou *et al.*, 2003; Zygmunt *et al.*, 2003), sendo a Ang-1 expressa principalmente pelo cito e sinciotrofoblasto, enquanto que a Ang-2 e Tie-2 são predominantemente expressas no citotrofoblasto (Dunk *et al.*, 2000). Estes resultados indicam um papel para angiopoietinas na angiogênese, regulando o comportamento do trofoblasto endovascular (Dunk *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Existe na região de decídua basal elevada relação Ang-2/Ang-1, o que sugere que a instabilidade vascular é favorecida em relação à maturação dos vasos sanguíneos no sítio de implantação (Plaisier *et al.*, 2007). Entretanto, este quadro muda ao longo da gestação, uma vez que há redução da Ang-2 e aumento da Ang-1 até o terço final, sugerindo que posteriormente o que predomina é a maturação vascular (Plaisier *et al.*, 2007; Plaisier, 2011). Isto poderia ser, em parte, regulado pela tensão de oxigênio na região da decídua neste período. Isso porque um ambiente de baixa tensão de oxigênio aumenta a secreção de Ang-2 e reduz a de Ang-1 (Zhang *et al.*, 2002).

As angiopoietinas são expressas variavelmente ao longo da gestação, de acordo com o período gestacional (Maisonpierre *et al.*, 1997; Charnock-Jones, 2002). Entretanto, foi observado que a Ang-2 exerce um papel antagonista a Ang-1. A expressão de Ang-2 é induzida por hipóxia e deixa as junções intercelulares mais frouxas e age sinergicamente ao VEGF-A aumentando o comprimento vascular e a rede vascular mais complexa, além da proliferação das células endoteliais (Maisonpierre *et al.*, 1997; Charnock-Jones, 2002). A Ang-2 tem sua expressão máxima no terço inicial da gestação em humanos declinando no terço médio. Isto sugere que a Ang-2 tenha um papel principal na vasculogênese predominante no terço inicial, além das ramificações vasculares no processo de angiogênese, o que resulta em aumento do comprimento vascular bem como na formação de novos brotos. Estes acontecimentos tornam a rede vascular mais complexa. A Ang-1, por sua vez, predomina no terço médio para o final da gestação o que resulta em angiogênese sem formações de novas ramificações e com a maturação da rede vascular para suportar o aumento do fluxo sanguíneo crescente na região (Geva *et al.*, 2002;

Plaisier *et al.*, 2007). Além disso, a Ang-1 mantém a integridade vascular e interfere com o remodelamento vascular, aumentando o diâmetro dos vasos e induzindo a formação do pericito (Maisonpierre *et al.*, 1997; Plaisier, 2011).

### 5.8. *Proteases pericelulares*

A invasão do trofoblasto pela decídua depende do equilíbrio preciso entre as proteases e os inibidores das proteases, o que permite a degradação extracelular e a fagocitose de células maternas e da ECM degradada (Solberg *et al.*, 2003). Este processo é fundamental para que o trofoblasto migre através do interstício materno e penetre os vasos da decídua e da glândula metrial para um adequado suprimento nutricional para o feto (Bany e Schultz, 2001; Solberg *et al.*, 2003; Huppertz e Peeters, 2005; Plaisier, 2011). A importância de proteases no início da gestação foi estudada em camundongos *knockout*. Contudo, efeitos significativos de proteases individuais na fertilidade não foram evidenciados (Cross *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Afonso *et al.*, 1997; Salamonsen, 1999; Bany e Schultz, 2001; Solberg *et al.*, 2003; Huppertz e Peeters, 2005; Plaisier, 2011). Estudos da expressão e da funcionalidade de pelo menos três classes de proteases, as metaloproteinases de matriz (MMPs), as proteases de serina e as proteases de cisteína, permitiram a observação do seu envolvimento com o remodelamento da matriz extracelular, facilitando a invasão do trofoblasto (Cross *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1996; Afonso *et al.*, 1997). A expressão do ativador da protease de serina do tipo uroquinase (uPA) (Sappino *et al.*, 1989; Teesalu *et al.*, 1996; Teesalu *et al.*, 1998) e de várias MMPs, incluindo MMP2, MMP9, MMP11 (Alexander *et al.*, 1996; Teesalu *et al.*, 1999; Balbín *et al.*, 2001), em ambas as células gigantes trofoblásticas e/ou decíduais, sugere que elas agem durante o processo de remodelamento decidual e na invasão de células que ocorrem durante a implantação e placentação.

Em um experimento com camundongos *knockout* deficientes para uPA, uPAR, MMP-3, MMP-7, MMP-9 ou MMP-MT1, foi demonstrado que eles são férteis. Possivelmente, existe alguma forma de compensação para a falta de um dos membros da família das MMP por um aumento da expressão de outro tipo de MMP (Salamonsen, 1999). Mas já foi evidenciado efeito sinérgico negativo entre os dois sistemas, o plasminogênio e as MMPs, na vascularização da decídua (Solberg *et al.*, 2003). Camundongos *Knouckout* para plasminogênio e que tiveram a ação das MMP inibidas propiciou alta letalidade dos embriões e/ou fetos. Este fato se deu possivelmente pelo atraso que ocorreu na decidualização e na invasão do trofoblasto endovascular. Em fases mais tardias da gestação detectou-se defeitos do desenvolvimento da vascularização e da camada do labirinto placentário (Solberg *et al.*, 2003).

A expressão das MT-MMPs e de uPA/uPAR parece ser modulada por hormônios da gestação, células uNKs e/ou trofoblastos extravilosos (Plaisier *et al.*, 2008). A expressão de proteases por células decíduais, células uNKs e trofoblastos sugere uma ação tanto autócrina quanto parácrina no remodelamento decidual e na infiltração de células imunes (Albertsson *et al.*, 2000; Curry e Osteen, 2003; Visse e Nagase, 2003; Plaisier *et al.*, 2008). Todas as MMPs, com exceção das MMP-10, MT-MMPs e uPA e uPAR foram expressas pelos trofoblastos extravilosos e estão envolvidas na invasão trofoblástica (Hofmann *et al.*, 1994; Salamonsen, 1999; Plaisier *et al.*, 2008). As MT2- e MT3-MMP regulam a angiogênese uterina e a sua expressão é reduzida nas

células endoteliais do sítio de implantação. A quantidade de MT-MMPs vascular tem correlação positiva com a densidade de vasos e correlação inversa com o diâmetro luminal vascular. Sendo assim, as MT-MMPs podem controlar o remodelamento vascular na gestação e prevenir a migração muito intensa das células endoteliais (Plaisier *et al.*, 2008).

## **6. Hormônio tireoidiano na reprodução de fêmeas**

### **6.1. Disfunções tireoidianas**

As disfunções tireoidianas são caracterizadas pelas alterações séricas dos hormônios tireoidianos (THs) triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tiroxina (T<sub>4</sub>). O hipertireoidismo é marcado pela elevação de T<sub>3</sub> e/ou T<sub>4</sub> em relação aos níveis normais de uma população e o hipotireoidismo caracterizado pela redução dos mesmos em relação à média da população (Maxie, 2007). Tanto o hiper quanto o hipotireoidismo são diagnosticados na clínica médica veterinária e humana e promovem muitos transtornos clínicos, pois interferem com praticamente todo o organismo.

Dentre os animais domésticos, os cães e os gatos têm maior frequência de disfunções tireoidianas (Daniel e Neelis, 2014). O hipertireoidismo felino é a manifestação mais comum, estando, mais comumente, relacionado ao desenvolvimento de doenças proliferativas da tireoide como a hiperplasia nodular, adenomas e carcinomas (Maxie, 2007; Daniel e Neelis, 2014; Varallo *et al.*, 2014). O hipotireoidismo, por sua vez, tem maior frequência na população canina com predisposição para algumas raças, dentre elas pode-se citar os Golden Retrievers, Pinschers Doberman, Dachshunds, Shetland Sheepdogs, Setters Irlandeses, Schnauzers Miniatura e Cocker Spaniels (Graham *et al.*, 2007; Maxie, 2007). Em cães, o hipotireoidismo é geralmente resultado de lesões primárias de tireoide, particularmente da tireoidite linfocítica e do colapso folicular idiopático (Maxie, 2007; Daniel e Neelis, 2014; Varallo *et al.*, 2014).

Os THs são conhecidos por influenciarem o desenvolvimento embrionário, pós-natal e o metabolismo de praticamente todo o organismo (Choksi *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008; Flood *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014). Estudos têm sido realizados avaliando-se os distúrbios reprodutivos tanto em fêmeas quanto em machos decorrentes das disfunções tireoidianas (Ariyaratne *et al.*, 2000; Stoker *et al.*, 2002; Boulogne *et al.*, 2003; Choksi *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2008; Ayala *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2011; Buras *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Na reprodução de fêmeas há evidências de que os THs interfiram com a interface materno-fetal na implantação, desenvolvimento da decídua e placenta ao longo da gestação e com o desenvolvimento embrionário e fetal (Krassas, 2000; Poppe e Glinoyer, 2003; Poppe e Velkeniers, 2004; Kilby *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2007; Poppe *et al.*, 2008; Krassas *et al.*, 2010; Colicchia *et al.*, 2014; Duarte-Guterman *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015).

### **6.2. A tireoide e os hormônios tireoidianos**

A liberação dos THs é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. O hipotálamo frente aos baixos níveis séricos de T<sub>4</sub> libera o hormônio liberador de tireotropina (TRH) que irá agir na adeno hipófise estimulando a liberação do hormônio tireoestimulante (TSH). A tireoide, por sua vez, sintetiza os THs sob a ação do TSH (Brent, 2012).

Existem algumas variações anatômicas da tireoide nas diferentes espécies de animais domésticos (Daniel e Neelis, 2014). Na maioria dos animais, a tireoide é composta por dois lóbulos distintos localizados em ambos os lados da superfície da traqueia distal e, por vezes, se sobrepõem a laringe (Daniel e Neelis, 2014). Em suínos o lobo principal da tireoide está na linha média na região cervical caudal com projeções dorsolaterais para cada lado (Maxie, 2007).

Histologicamente, a tireoide é constituída de folículos de diversos tamanhos revestidos por epitélio simples cúbico a prismático com polaridade secretória voltada para a região central do folículo. Os folículos predominantemente encontram-se distendidos e repletos de material homogêneo, acelular, fortemente eosinofílico pela coloração de hematoxilina-eosina, denominado coloide. O coloide é composto de tireoglobulinas, que posteriormente são clivadas nos hormônios tireoidianos, triiodotironina ( $T_3$ ) e tiroxina ( $T_4$ ) (Choksi *et al.*, 2003; Maxie, 2007).

Os THs são internalizados na superfície apical das células epiteliais da tireoide por endocitose. Os lisossomos contendo as enzimas hidrolíticas se fundem aos endossomos e liberam os hormônios que estão ligados a uma proteína transportadora, sintetizada no fígado, sendo distribuídos para outros tecidos por meio da circulação sanguínea (Choksi *et al.*, 2003). A  $T_3$  é considerada o hormônio biologicamente ativo sendo prontamente utilizada pelas células alvo. Contudo, a  $T_3$  é liberada em menor quantidade pela tireoide. Por outro lado, a  $T_4$  é considerada o pró-hormônio e é secretada e encontrada em maior quantidade no organismo, sendo que sua metabolização em  $T_3$  na célula alvo ocorre por meio da deiodinação (Choksi *et al.*, 2003; Maxie, 2007; Zanatta *et al.*, 2013).

### **6.3. Hormônios tireoidianos, seus receptores e ações**

Para que os THs possam agir nas células alvo é fundamental que eles atravessem a membrana plasmática. O transporte dos THs através da membrana plasmática é realizado por proteínas específicas da superfamília dos transportadores monocarboxilados (MCT) 8 e 10 (Merezhinskaya e Fishbein, 2009; Duarte-Guterman *et al.*, 2014), além do polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1c1 (Oatp1c1), o transportador do tipo aminoácido-L (LAT- do inglês *L-type amino acid transporters*) (Visser *et al.*, 2008; Colicchia *et al.*, 2014; Duarte-Guterman *et al.*, 2014; Ramos e Zamoner, 2014) e o polipeptídeo cotransportador taurocolado/ $Na^+$  (SLA10a, antigo Ntcp, do inglês *Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide*) (Visser *et al.*, 2010). Bonen e colaboradores (2006) pesquisaram a distribuição de vários MCTs, por imunistoquímica, em vários tecidos do organismo e o MCT8 foi expresso no testículo e cérebro de ratos. Além disso, os transportadores são expressos também na interface materno-fetal (Lewis *et al.*, 2007; Loubière *et al.*, 2010; Vasilopoulou *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011; Vasilopoulou *et al.*, 2013; Colicchia *et al.*, 2014; Muzzio *et al.*, 2014; Vasilopoulou *et al.*, 2014).

O RNAm para seis diferentes tipos de transportadores de membrana para THs, MCT8, MCT10, LAT1, LAT2, Oatp1a2 e Oatp4a1, é expresso em diferentes tipos celulares da placenta (Loubière *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011; Colicchia *et al.*, 2014; Muzzio *et al.*, 2014). As células uNKs e os macrófagos provenientes da decídua de mulheres expressam MCT8 e MCT10 desde

o início da gestação (Vasilopoulou *et al.*, 2014). Além disso, são expressos também em ovário de *zebrafish* (Muzzio *et al.*, 2014). Em humanos, as proteínas dos transportadores dos THs podem ser encontradas a partir de 6 semanas de gestação em citotrofblastos, sinciotrofblastos e citotrofblastos extravilosos, com padrões de expressão e intensidade distintas ao longo da gestação (Loubière *et al.*, 2010; Colicchia *et al.*, 2014). A localização do Oatp4a1 e Lat2 na superfície apical de sinciotrofblastos (Lewis *et al.*, 2007; Loubière *et al.*, 2010) sugere seu envolvimento direto na captação de THs do sangue materno. Apesar dos transportadores de membrana terem alta afinidade pelos THs, eles também podem transportar outras proteínas. Sendo assim, a expressão de MCT8, o MCT10 e o Oatp1a2 nos citotrofblastos das vilosidades coriônicas e intersticiais sugere a ação local dos THs na placenta e sua passagem para o feto (Vasilopoulou *et al.*, 2013). Indivíduos gestantes com hipotireoidismo associado a feto com restrição de crescimento intrauterino apresentam elevação da expressão placentária de MCT8 (Loubière *et al.*, 2010; Colicchia *et al.*, 2014). O aumento de MCT8 associada à diminuição de MCT10 resulta em acúmulo de T<sub>3</sub> intracelular sem alteração da atividade das deiodinases. E sabe-se que o acúmulo intracelular de T<sub>3</sub> induz a apoptose de células trofoblásticas (Vasilopoulou *et al.*, 2010). Uma possibilidade é que estes dois fatos associados possam interferir com a proliferação e apoptose durante a formação da placenta, resultando em placentas de baixa eficiência.

Uma vez no citoplasma da célula, a T<sub>4</sub> precisa tornar-se metabolicamente ativa. A T<sub>4</sub> é o hormônio presente em maior quantidade na circulação sanguínea, entretanto é considerada pró-hormônio. A sua metabolização em T<sub>3</sub>, que é a principal forma ativa, é, portanto, crucial para que os THs atuem. Para isso, existe um sistema de enzimas conhecido como deiodinases que são responsáveis pela metabolização intracelular dos THs (Kester *et al.*, 2006). A deiodinação é um processo que visa manter a homeostase dos THs no interior das células alvo para o perfeito metabolismo celular através de sua ação genômica pela 5' monodeiodinação (Zanatta *et al.*, 2013). As deiodinases são divididas em três tipos: D1, D2 e D3 (Gereben *et al.*, 2008; Kester *et al.*, 2006; Ramos e Zamoner, 2014). Todas as deiodinases são proteínas ancoradas à membrana, de 29-33 kDa, com intensa homologia na sequência genômica. A propriedade catalítica dessas enzimas se dá pela existência de selenocisteína (Sec) em sua região central (Dentice *et al.*, 2013).

As D1 e D2 catalisam a remoção do átomo de iodo para fora do anel gerando a 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) (Kester *et al.*, 2006; Dentice *et al.*, 2013; Ramos e Zamoner, 2014). D1 é expressa no fígado, rim e tireoide, sendo responsável pela liberação de T<sub>3</sub> para a circulação sanguínea (Dentice *et al.*, 2013). A D2 está localizada no retículo endoplasmático e sua expressão e ação aumenta em casos de hipotireoidismo, aumentando a disponibilidade de T<sub>3</sub> no tecido alvo (Dentice *et al.*, 2013). A D3 catalisa a remoção do iodo a partir do anel interno gerando uma forma inativa do hormônio, a rT<sub>3</sub> (reversa 3,3',5'-triiodotironina), e a diiodotironina (T<sub>2</sub>) (Galton *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2003; Galton, 2005; Hernandez, 2005; Kester *et al.*, 2006; Akturk *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Ramos e Zamoner, 2014). D1, D2 e D3 são expressas no trato reprodutivo feminino, inclusive durante a gestação (Galton *et al.*, 1999; Galton *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2003; Wasco *et al.*, 2003; Galton, 2005; Hernandez, 2005; Kester *et al.*,

2006; Akturk *et al.*, 2013; Colicchia *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2014) e no trato reprodutivo masculino (Ramos e Zamoner, 2014) em diferentes níveis ao longo da vida do indivíduo.

A atividade da D3 predomina no período de desenvolvimento e reduz na vida adulta, apesar de se manter elevada em alguns sítios específicos, como cérebro, placenta, útero gestante e tecidos fetais. Desta forma, a D3 limita a passagem transplacentária dos THs e regula o desenvolvimento fetal (Galton, 2005; Kester *et al.*, 2006; Akturk *et al.*, 2013). O cotransportador Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS- do inglês *Na<sup>+</sup>/I symporter*) é uma glicoproteína de membrana plasmática que capta iodeto ativo. A NIS, juntamente com a D3 contribuem para a regulação do metabolismo dos THs na interface materno-fetal por serem expressos tanto na placenta e membranas fetais, quanto na decídua em mulheres com gestação normal (Akturk *et al.*, 2013). Além disso, a D3 também é expressa na pele, epitélio respiratório e digestório fetal, bem como nas artérias e veia umbilicais com a finalidade de proteger o feto dos níveis elevados de THs materno (Mortimer *et al.*, 1996; Galton *et al.*, 1999; Carvalho, 2003; Huang *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2009; Akturk *et al.*, 2013). Foi observado em ratas, que após a implantação do blastocisto ou após a indução da decidualização, houve intenso aumento da atividade da D3 na interface materno-fetal (Wasco *et al.*, 2003). Nesta fase, em ratas gestantes, somente foi possível observar a presença de D3 ao redor do embrião, nas células deciduais, não sendo observada nas áreas interimplantação (Deng *et al.*, 2014). Um estudo demonstrou também que a D3 é expressa na decídua de ratas aos 9 DG e essa expressão se mantém alta ao longo da gestação, ultrapassando a intensidade de expressão observada na placenta (Galton *et al.*, 1999). Pesquisas têm demonstrado a grande influência do E2 e da P4 na expressão placentária e uterina de D3 (Wasco *et al.*, 2003; Kester *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2014). A expressão de D3 também é regulada pelo AMPc através da proteína cinase-A AMPc uma vez que quando essa via é bloqueada, a expressão de D3 reduz e a decidualização ocorre de forma inadequada (Deng *et al.*, 2014).

Na interface materno-fetal, tanto na placenta quanto na decídua, também existe a expressão de D2. Camundongos expressam D2 no útero nos dias 3 e 4 de gestação (Deng *et al.*, 2014). Um estudo revelou que ratas gestantes apresentam atividade crescente de D2 ao longo da gestação, com máxima expressão no 17º dia, sendo mais intensa nas células deciduais do que na placenta (Galton *et al.*, 2001). O transporte da T<sub>3</sub> no citoplasma da célula alvo até o núcleo ocorre por um grupo de proteínas carreadoras de triiodotironina citossólica (CTBs) em ratos e humanos. As CTBs foram identificadas tanto no citoplasma quanto no núcleo em células do cérebro, músculo, coração, fígado, rim e do sistema reprodutor (Suzuki *et al.*, 2003).

Os hormônios tireoidianos agem nas células alvo por meio da ligação aos seus receptores nucleares (TRs). A T<sub>3</sub> tem maior afinidade pelos TRs do que a T<sub>4</sub>. Os TRs pertencem a super-família dos receptores de hormônios esteroides/tireoide nucleares (Cheng *et al.*, 2010; Duarte-Guterman *et al.*, 2014; Ramos e Zamoner, 2014). Existem dois tipos de TRs, TR $\alpha$  e TR $\beta$  (Brente, 2012; Duarte-Guterman *et al.*, 2014; Darras *et al.*, 2015) com as isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\alpha$ 3 e TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, que promovem a ação genômica (Wagner *et al.*, 2009; Darras *et al.*, 2015). Indivíduos com mutação nos genes do TR $\alpha$  apresentam sinais clínicos típicos de hipotireoidismo. Seu desenvolvimento mental e motor são afetados e seu crescimento músculo

esquelético é retardado (Flamant e Gautier, 2013). Contudo, indivíduos que apresentam mutação nos genes do TR $\beta$  apresentam resistência ao hormônio tireoidiano com elevação sérica de T<sub>3</sub> e características clínicas de hipotireoidismo (Flamant e Gautier, 2013).

Os TR $\alpha$  são expressos em maior quantidade no cérebro, coração e nos ossos enquanto que no rim a isoforma predominante é o TR $\beta$  (Cheng *et al.*, 2010). No sistema reprodutor feminino as isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 estão presentes nos trofoblastos intersticiais, extravilosos (Kilby *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2005; Colicchia *et al.*, 2014) e nas células intersticiais da placenta (Kilby *et al.*, 1998), com predomínio nuclear em humanos (Kilby *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2005; Colicchia *et al.*, 2014). Interessantemente, há aumento da intensidade de imunomarcagem ao longo da gestação (Kilby *et al.*, 1998). Na placenta de ratas não foi observado aumento de transcritos gênicos para TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 entre os dias 16 e 21 de gestação. Entretanto, nos tecidos fetais houve crescente expressão de TR $\alpha$ 1 (Leonard *et al.*, 2001). Além disso, foi observado que as células uNKs e os macrófagos provenientes da decídua de mulheres expressam TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 desde o início da gestação (Vasilopoulou *et al.*, 2014).

Os TRs, quando ativados pelos THs, são fatores de transcrição gênica que potencializam as regiões promotoras de genes alvo e interagem com os complexos de co-repressores e co-ativadores (Cheng *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Zamoner *et al.*, 2011; Duarte-Guterman *et al.*, 2014; Ramos e Zamoner, 2014). O complexo receptor-hormônio dimeriza o receptor X do ácido retinóico (RXR) ou com outro TR para regular a transcrição. A ligação do complexo a uma região promotora do gene alvo pode aumentar ou reprimir a expressão desse determinado gene (Tsai e O'Malley, 1994; Cheng *et al.*, 2010; Duarte-Guterman *et al.*, 2014). Na ausência de T<sub>3</sub>, os TRs suprimem a expressão de genes alvo pela interação com co-repressores transcricionais tais como o SMRT (do inglês: *silencing mediator of retinoic acid and thyroid receptors*).

Outra categoria de receptores para os THs tem sido discutida. Recentemente demonstrou-se que existem receptores de membrana para os hormônios tireoidianos, que seriam as integrinas  $\alpha$ V $\beta$ 3 e o receptor acoplado a proteína G. Estes receptores de membrana estão ligados, por exemplo, ao controle do fluxo de íons nas células (Cheng *et al.*, 2010; Zamoner *et al.*, 2011; Zanatta *et al.*, 2013; Duarte-Guterman *et al.*, 2014). Os receptores de membrana para os hormônios tireoidianos quando estimulados promovem efeito não genômico que está ligado ao fluxo de diferentes íons através da membrana plasmática, além da transdução de sinais intracelulares pela via das cinases, no acúmulo de aminoácidos, na modulação de nucleotídeos extracelulares e no citoesqueleto de vimentina (Zamoner *et al.*, 2005; Zamoner *et al.*, 2011; Duarte-Guterman *et al.*, 2014). Existe, por exemplo, o aumento do influxo de cálcio para o interior das células de Sertoli cultivadas com T<sub>3</sub>, possibilitando a fosforilação do citoesqueleto de vimentina no seu processo de maturação (Zamoner *et al.*, 2005). A T<sub>3</sub> também estimula o acúmulo de aminoácidos basais quando os receptores de membrana são estimulados (Zanatta *et al.*, 2013). Além disso, o aumento de T<sub>4</sub> resulta no aumento da síntese de filamentos intermediários em células do sistema nervoso de ratos independente do aumento da síntese de proteínas intracitoplasmáticas, ou seja, sem a ação genômica do hormônio. Os hormônios tireoidianos são importantes moduladores do citoesqueleto de células neurais durante o desenvolvimento por meio dos receptores de membrana. Estas ações podem se repetir em outros sítios do organismo (Zamoner *et al.*, 2008).

#### 6.4. As disfunções tireoidianas e a gestação

Os THs são fundamentais para o desenvolvimento e crescimento de muitos tecidos, bem como para a regulação de seu metabolismo tanto na embriogênese e maturação fetal quanto na interface materno-fetal ao longo da gestação (James *et al.*, 2007; Dentice *et al.*, 2013; Heijlen *et al.*, 2013; Forhead e Fowden, 2014). As concentrações de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> fetais são dependentes da idade gestacional, condições nutricionais e endócrinas do útero, permeabilidade placentária aos THs, que, por sua vez, é dependente da espécie animal (Forhead e Fowden, 2014). Os THs são necessários tanto para o crescimento fetal como um todo quanto para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso (Forhead e Fowden, 2014). Além disso, os THs promovem a diferenciação dos tecidos fetais na gestação a termo e atuam sinergicamente aos glicocorticoides no pré-parto, garantindo a viabilidade fetal (Forhead e Fowden, 2014). Alterações dos níveis dos THs, hipóxia e acidose estão associados a patogênese da restrição do crescimento fetal intrauterino e ao baixo crescimento de crianças (Thorpe-Beeston *et al.*, 1991; Kilby *et al.*, 1998). Normalmente, os níveis séricos fetais de THs aumentam do terço médio para o final da gestação em humanos (Kilby *et al.*, 1998). Contudo, as concentrações séricas de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> no feto com restrição de crescimento intrauterino são menores do que em fetos normais (Kilby *et al.*, 1998).

Também foi observado que crianças com baixo peso ao nascimento apresentam reduções significativas das concentrações totais de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (Klein *et al.*, 1997). Um quadro de hipotireoidismo transitório com baixos níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> total e livre está associado a partos prematuros e baixo desenvolvimento na vida pós-natal no primeiro mês de vida (Fisher 1997). Ratas com disfunção tireoidiana apresentam alteração na expressão de fatores angiogênicos pela célula trofoblástica e ratas com hipotireoidismo têm redução de capilares fetais, dilatação dos seios vasculares maternos do labirinto placentário e redução do peso feto-placentário (Silva *et al.*, 2012). Além disso, o hipotireoidismo reduz a migração endovascular e intersticial de trofoblastos fetais, e a expressão de TLR4, IFN $\gamma$ , MIF, IL10, iNOS, MMP2 e MMP9 e leptina placentária, e aumenta a expressão de TLR2 (Silva *et al.*, 2014). As ratas tratadas com T<sub>4</sub>, pelo contrário, têm o aumento da taxa de concepção (Freitas *et al.*, 2007). Outro fato curioso é que não apenas as ratas tratadas com T<sub>4</sub> aumentam a expressão de IL10 e iNOS como também tem a expressão reduzida de TNF $\alpha$  e MIF aos 10 DG. Contudo, aos 19 DG, a expressão de IFN $\gamma$  e MIF aumenta (Silva *et al.*, 2014). O excesso de T<sub>4</sub> também aumenta a expressão gênica de *Mmp2* aos 10 dias, mas reduz a migração de trofoblasto endovascular aos 18 DG (Silva *et al.*, 2014). Além disso, através do cultivo de células decíduais, uNKs e macrófagos, oriundos da decídua de mulheres gestantes, em meio enriquecido com T<sub>3</sub>, observou-se que houve redução de VEGF-A, aumento de angiopoietina-2 e influência no padrão de secreção de citocinas, variando de acordo com o período gestacional (Vasilopoulou *et al.*, 2014). Já o cultivo de células trofoblásticas em 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-9</sup>M de T<sub>3</sub> aumentou a expressão gênica de VEGF, PGIF e IFN $\gamma$ , contudo reduziu a expressão de VEGF na dose de 10<sup>-4</sup> M de T<sub>3</sub> (Silva *et al.*, 2015). O conjunto desses achados nos permite concluir que a ação dos THs nas células alvo depende do seu nível sérico, da conformação adequada das proteínas de membrana, dos receptores nucleares e de membrana e de transdutores de sinais intracelulares (Dentice *et al.*, 2013; Colicchia *et al.*, 2014).



Os MCTs são proteínas de membrana responsáveis pela entrada dos THs nas células, como mencionado anteriormente. E sabe-se que, no terço médio da gestação em humanos, existe forte imunexpressão de MCT8 nas células decíduais (Chan *et al.*, 2006). Em placentas oriundas de indivíduos com grave restrição do crescimento fetal intrauterino foi detectado aumento tanto de transcritos gênicos (Chan *et al.*, 2006) quanto da proteína MCT8 (Loubiere *et al.*, 2010), em comparação com a placenta de gestações normais. Contudo, indivíduos que apresentaram o mesmo quadro patológico tiveram a redução do transportador MCT10 no tecido placentário (Chan *et al.*, 2006). Os efeitos coordenados dos transportadores de membrana dos THs podem colaborar tanto com a regulação local quanto com a passagem transplacentária desses hormônios. Este fato pode ser de fundamental importância para o desenvolvimento normal do feto e da placenta humana (Chan *et al.*, 2009).

Outro fator importante que determinará a ação dos THs na interface materno-fetal e no desenvolvimento do feto é a atividade adequada das enzimas iodotironinas deiodinases. Atividades de todos os três subtipos, D1, D2 e D3 foram demonstradas em placentas de ratas (Bates *et al.*, 1999). A placenta humana expressa as deiodinases D2 e D3 de forma crescente com o avançar da gestação, sendo que há predomínio da última, aproximadamente 200 vezes mais (Koop Donk-Kool *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2003). Desta forma, sugere-se que a D2 não participa efetivamente do controle dos níveis séricos de T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> fetais. Contudo, a ação da D2 ativando os THs na interface materno-fetal provoca uma ação autócrina/parácrina na placenta e decídua estimulando a diferenciação das células trofoblástica e decíduais (Maruo *et al.*, 1995).

A maior expressão de D3 na placenta de humanos sustenta a hipótese de “proteção” do feto frente aos elevados níveis séricos de T<sub>4</sub> materno. Isso pode ser reforçado pelo fato de recém-nascidos com agenesia de tireoide, sem síntese própria de THs, não apresentarem aumento de atividade de D3 placentária, uma vez que necessitam do hormônio materno para seu desenvolvimento (Koop Donk-Kool *et al.*, 1996). Casos de restrição de crescimento fetal intrauterino também não apresentaram diferenças na expressão de D2 e D3 na interface materno-fetal (Chan *et al.*, 2003). Entretanto, o cultivo de citotrofoblastos, oriundos de placenta humana, com T<sub>3</sub> em concentração de 100 nM, que é suprafisiológica, resultou em aumento da expressão de RNAm de D2 e D3 (Chan *et al.*, 2003). A implantação do blastocisto ocorre em ambiente de baixa concentração de oxigênio (Aplin, 1997; Aplin *et al.*, 2000). Células em condições de hipoxia induzem deiodinase D3 via HIF1 $\alpha$ -dependente reduzindo o metabolismo basal celular (Simónides *et al.*, 2008). Isso ocorreria porque D3 promove a inativação de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, criando uma espécie de hipotireoidismo local, reduzindo o gasto energético celular (Simonides *et al.*, 2008).

Tendo-se na interface materno-fetal a biodisponibilidade de T<sub>3</sub>, por ação das deiodinases, ela irá se ligar aos TRs para promover sua ação local (Banovac *et al.*, 1986; Forhead e Fowden, 2014). Os TR $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\beta$ 1 estão presentes nas vilosidades placentárias, no núcleo dos citotrofoblastos, sincíotrofoblastos, células do estroma placentário (Kilby *et al.*, 1998) e trofoblastos extravilosos (Barber *et al.*, 2005). O aumento da expressão proteica de TRs nessas células foi observado na redução sérica dos THs fetal em casos de restrição de crescimento intrauterino (Kilby *et al.*, 1998). Um estudo *in vitro* revelou que T<sub>3</sub> e EGF exercem efeito sinérgico no que

se refere a atividade antiproliferativa e no aumento da motilidade de citotrofoblastos e trofoblastos extravilosos (Barber *et al.*, 2005). Contraditoriamente, T<sub>3</sub> e EGF estimulam a proliferação de células de coriocarcinoma (Barber *et al.*, 2005). Esses fatos permitem inferir que T<sub>3</sub> e EGF regulam sinergicamente a proliferação e a função de trofoblastos humanos (Barber *et al.*, 2005).

Os THs agem nos trofoblastos promovendo proteção por meio do controle da apoptose dos mesmos. O equilíbrio entre proliferação e apoptose nas diferentes camadas placentárias e nos trofoblastos extravilosos é fundamental para um aporte nutricional adequado ao feto. A maior taxa de apoptose ocorre nos trofoblastos extravilosos e está associada ao aumento da expressão de Fas e Fas ligante e redução da expressão da proteína Bcl-2 (Murakoshi *et al.*, 2003). E foi observado que, em concentrações fisiológicas de 10<sup>-8</sup> M, T<sub>3</sub> suprime a apoptose de trofoblastos extravilosos do início da gestação, por meio da inibição de Fas e Fas ligante e a clivagem de caspase-3 e PARP (Laoag-Fernandez *et al.*, 2004). Células trofoblásticas cultivadas com T<sub>3</sub> (10<sup>-8</sup> M) ou T<sub>4</sub> (10<sup>-7</sup> M) apresentam aumento da secreção de P4, 17β-estradiol, hCG e hPL (Maruo *et al.*, 1991). E quando se associa pregnenolona e testosterona (10<sup>-8</sup> M) há maior aumento na secreção de P4 e E2, respectivamente, o que sugere que a T<sub>3</sub> aumenta a 3β-hidroxiesteróide desidrogenase e a atividade da aromatase placentária (Maruo *et al.*, 1991).

Uma adequada invasão das células trofoblásticas na decídua, bem como o desenvolvimento vascular são fundamentais para o sucesso da gestação. A invasão trofoblástica e a vascularização decidual inadequadas estão associadas a patologias como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino (Robertson *et al.*, 1985). Por meio de um ensaio de invasão trofoblástica *in vitro*, observou-se que o tratamento com T<sub>3</sub> aumentou significativamente o número de projeções dos trofoblastos extravilosos (Oki *et al.*, 2004). Além disso, T<sub>3</sub> estimulou a expressão de RNAm de MMP2, MMP3, fibronectina oncofetal (onfFN) e α5β1 sem, contudo, alterar a expressão de TIMP1 (Oki *et al.*, 2004). A expressão desses fatores facilita a migração dos trofoblastos extravilosos através da matriz extracelular da decídua e, como mencionado anteriormente, T<sub>3</sub> reduz a apoptose dessas células. Estes resultados associados podem ocasionar uma invasão de células trofoblásticas mais profunda e conseqüente expoliação materna (Oki *et al.*, 2004).

## CAPÍTULO 2

### **Os hormônios tireoidianos afetam a decidualização e a angiogênese na decídua e na glândula metrial de ratas**

*(aceito para publicação na Pesquisa Veterinária Brasileira- ANEXO 2)*

#### **1. Resumo**

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos hormônios tireoidianos sobre a decídua e a glândula metrial de ratas e analisar a expressão de fatores angiogênicos. 72 ratas adultas, fêmeas foram distribuídas nos grupos hipotiroideo, tratado com T<sub>4</sub> e controle. Aos 10, 14 e 19 dias de gestação (DG), a decídua e a glândula metrial foram coletadas para avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica da expressão de VEGF, Flk-1 e Tie-2. O hipotireoidismo reduziu a área da decídua aos 10 e 19 DG. Além disso, o VEGF aumentou aos 10 e 14 DG e Flk-1 apenas aos 14 DG, mas ambos foram reduzidos aos 19 DG na glândula metrial sem alterar significativamente a área ocupada pelos vasos sanguíneos. As ratas tratadas com T<sub>4</sub> mostraram um aumento nos vasos sanguíneos deciduais aos 10 e 19 DG. No entanto, aos 10 DG, o excesso de T<sub>4</sub> resultou no aumento de Flk-1 na decídua e na glândula metrial. O hipotireoidismo aumentou o Tie-2 em 10 e 19 DG na decídua e na glândula metrial. Em conclusão, o hipotireoidismo reduz a área da decídua e aumenta a expressão de VEGF, Tie-2 e Flk-1. O excesso de T<sub>4</sub> promove a angiogênese tecidual ao aumentar o número de vasos na decídua associado ao aumento da expressão de Flk-1.

Palavras-chaves: decídua, glândula metrial, tiroxina, PTU, angiogênese.

#### **2. Abstract**

This study aimed to evaluate the effects of thyroid hormone on the decidua and metrial gland of rats and to examine the expression of angiogenic factors. 72 adult, female rats were divided into hypothyroid, T<sub>4</sub>-treated, and control groups. At 10, 14 and 19 days of gestation (DG), the decidua and metrial gland were collected for histomorphometric and immunohistochemical evaluation of the expression of VEGF, Flk-1 and Tie-2. Hypothyroidism reduced the area of the decidua at 10 and 19 DG. Furthermore, VEGF was increased at 10 and 14 DG, and Flk-1 only at 14 DG, but both was reduced at 19 DG in the metrial gland without significantly changing the area occupied by blood vessels. Rats treated with T<sub>4</sub> showed an increase in the decidua blood vessels at 10 and 19 DG. However, at 10 DG, excess T<sub>4</sub> resulted in increased of Flk-1 in the decidua and metrial gland. Hypothyroidism increased the Tie-2 at 10 and 19 DG in the decidua and metrial gland. In conclusion, hypothyroidism reduces the area of the decidua and increases the expression of VEGF, Tie-2 and Flk-1. The excess of T<sub>4</sub> promotes tissue angiogenesis by increasing the number of vessels in the decidua associated to the increased expression of Flk-1.

Key words: decidua, metrial gland, thyroxine, PTU, angiogenesis

### 3. Introdução

A angiogênese na interface materno-fetal é crítica para o desenvolvimento adequado da placenta e, portanto, do feto (Reynolds *et al.*, 2010). Mudanças nesse processo resultam em várias complicações na gestação, como o pré-eclâmpsia, o crescimento intrauterino retardado (IUGR), o aborto espontâneo e a morte fetal (Coulam, 2000; Malassiné *et al.*, 2003; Toder *et al.*, 2003; Redry *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2012).

A decídua, também conhecida como placenta materna, é importante tanto para ancorar o tecido fetal placentário quanto para coordenar, direta ou indiretamente, o remodelamento vascular geral na interface materno-fetal (Reynolds *et al.*, 2010). Através da produção de citocinas e factores de crescimento, tais como VEGF, angiopoietinas (Ang) e factor de crescimento placentário (PlGF), as células decíduais coordenam a substituição do endotélio vascular das artérias espirais uterinas maternas pelas ações das células trofoblásticas para estabelecer a placenta hemochorial. Durante esse processo, há perda do músculo liso das artérias, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (Ong *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2007).

Em ratas, cuja placenta é hemochorial e semelhante à dos humanos, o remodelamento vascular ocorre a partir do terço médio da gestação, período que também coincide com o início da migração das células trofoblásticas para a decídua (Pinenborg *et al.*, 1981; Ain *et al.*, 2003a, b; Caluwaerts *et al.*, 2005; Vercruysse *et al.*, 2006; Pijnenborg e Vercruysse, 2010; Soares *et al.*, 2012). Durante este processo, há invasão extensiva da decídua por células *Natural Killer* uterinas em estreita associação com a artéria espiral uterina em humanos e ratas (Chakraborty *et al.*, 2011; Chazara *et al.*, 2011). Do mesmo modo que os seres humanos, os trofoblastos de ratas invadem profundamente a decídua, estendendo-se ao triângulo mesometrial, diferente dos camundongos em que a invasão trofoblástica é muito limitada e confinada à decídua mesometrial (Silva e Serakides, 2016).

No entanto, embora algumas semelhanças estimulem o uso da rata como modelo para o estudo da interface materno-fetal de primatas humanos e não humanos (Enders e Blankenship, 1999; Georgiades *et al.*, 2002; Shortman e Liu, 2002; Carter e Enders, 2004; Carter, 2007; Carter e Mess, 2007; Dilworth e Silbley, 2013; Silva e Serakides, 2016), existem algumas diferenças na estrutura, desenvolvimento placentário e alguns tipos de células trofoblásticas entre as placentas humanas e da rata (Silva e Serakides, 2016). Durante a placentação na rata, a parte fetal é organizada em labirinto placentário e zona juncional (camada de espongiotrofoblasto mais camada de células gigantes), diferente da placenta humana organizada em placenta vilosa (citotrofoblasto) e sinciotrofoblasto trofoblasto extraviloso (EVT). O EVT é semelhante aos trofoblastos invasores de ratas que migram para a decídua (Silva e Serakides, 2016). O volume da decídua e de cada camada da placenta fetal muda de acordo com o período gestacional. Nos murinos, nos terços inicial e médio da gestação há aumento no volume das camadas placentárias e no terço médio até o final há redução, sendo que a camada do labirinto placentário torna-se mais proeminente. Além disso, nos murídeos há aumento dos vasos sanguíneos fetais em que a proporção de espaço sanguíneo materno permanece estável ao longo da gestação (Favaron *et al.*, 2013). A interação entre os vasos sanguíneos fetais e o espaço vascular materno na rata tem uma organização labiríntica. Esta região corresponde às vilosidades placentárias humanas que são

cercadas por um espaço intervilloso através do qual flui o sangue materno (Silva e Serakides, 2016). Nesta região, a relação entre as células trofoblásticas e o endotélio dos vasos fetais é hemomonocorial em humanos, enquanto que na placenta de ratas é hemotricorial, isto é, com uma ou três camadas de trofoblasto, respectivamente (Furukawa *et al.*, 2014).

O hipotireoidismo materno é conhecido por resultar em baixo peso ao nascer e anormalidades placentárias (Silva *et al.*, 2012). Em contraste, o hipertireoidismo promove aumento da taxa de concepção sem afetar o peso ou a viabilidade fetal (Freitas *et al.*, 2007). As ratas hipotireoideas apresentam a vasculatura do labirinto placentário comprometida e uma expressão trofoblástica reduzida do VEGF e do seu receptor Flk-1 até o final da gestação. Além disso, há redução na expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da migração trofoblástica intrauterina, importantes para a vasodilatação e remodelação vascular intrauterina (Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Silva *et al.* (2015) observaram que o hipertireoidismo reduz a expressão de VEGF e Flk-1 em células trofoblásticas ao final da gestação, o que sugere que tais alterações possam estar relacionadas ao parto prematuro exibido por essas ratas (Krammerer *et al.*, 2005; Freitas *et al.* 2007; Andraweera *et al.*, 2012). No entanto, as avaliações da decidualização e a expressão de fatores angiogênicos na decídua e na glândula metrial de animais com disfunção tireoidiana permanecem mal caracterizadas. A decídua influencia todo o processo de placentação (Galton *et al.*, 1999; Galton *et al.*, 2001). Portanto, nossa hipótese é de que as alterações do disco placentário observadas em ratas com disfunção tireoidiana (Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015) possam refletir alterações na decídua e na glândula metrial.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do hipotireoidismo e do excesso de tiroxina na decidualização e na expressão dos fatores angiogênicos VEGF, Flk-1 e Tie-2 pela imunoistoquímica na decídua e na glândula metrial a partir do terço médio da gestação em ratas.

#### **4. Material e Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo número 239/11).

##### ***4.1. Manipulação de animais e indução de disfunção tireoidiana***

Um total de 72 ratas Wistar de dois meses de idade foram alojadas em caixas plásticas (6 animais/caixa), onde receberam alimento comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas sob condições de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas aleatoriamente em três grupos: controle, hipotiroideo e tratado com T<sub>4</sub>, num total de 24 animais por grupo. O grupo hipotiroideo recebeu, por sonda orogástrica, 1 µg/animal/dia de propiltiouracil (PTU) diluído em 5 mL de água destilada (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). As ratas tratadas com T<sub>4</sub> receberam 50 µg/animal/dia de L-tiroxina (T<sub>4</sub>) (Serakides *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013) diluídos em 5 mL de água destilada por sonda orogástrica diariamente. Os animais do grupo controle receberam água destilada no mesmo volume que os grupos tratados.

Cinco dias após o início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas a citologia vaginal (Marcondes *et al.*, 2002) para avaliação do ciclo estral. As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos durante 12 horas no período da noite. Pela manhã, foram realizados esfregaços vaginais para detectar a presença de espermatozoides. Quando os espermatozoides foram observados, a cópula foi confirmada e esse dia foi designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as fêmeas foram alojadas individualmente em caixas plásticas. Os animais dos grupos controle, hipotiroideo e tratado com T<sub>4</sub> continuaram com o tratamento como descrito anteriormente, até o dia da eutanásia.

#### ***4.2. Coleta de amostras de sangue e eutanásia***

Um total de seis animais por grupo foi eutanasiado aos 0, 10, 14 e 19 dias de gestação (DG) com uma sobredosagem anestésica. Após anestesia com xilazina (5-10 mg/kg intramuscular) e quetamina (50-150 mg/kg intramuscular), as ratas foram submetidas a colheita de amostras de sangue por punção intracardíaca até à morte em 0 DG e 19 DG. O sangue foi recolhido em tubos com heparina para se obter o plasma e este foi armazenado a -20°C para subseqüentes mensurações dos níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livres. As análises foram realizadas utilizando o método de quimioluminescência totalmente automatizado, de acordo com as recomendações do fabricante.

#### ***4.3. Necropsia***

Após a eutanásia, aos 10 DG, DG 14 e DG 19, o útero e a placenta contendo os fetos foram separados das tubas uterinas e ovários. A decídua, juntamente com as glândulas metriais e discos placentários de quatro locais de inserção placentária por rata, foi fixada em paraformaldeído a 4%, refrigerado, durante 24 horas. As decíduas foram processadas utilizando a técnica rotineira de inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de secções de 4 µm em lâminas silanizadas para coloração com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson, ou imunocoloração para VEGF, Flk-1 e Tie-2. As secções histológicas sempre foram realizadas na mesma seção transversal, incluindo a decídua, a glândula metrial e o disco placentário, para padronizar os locais de análise.

#### ***4.4. Análise histomorfométrica***

Foram estudadas a decídua e a glândula metrial da região mesometrial. Secções histológicas de decídua foram coradas com HE ou tricrômico de Masson e avaliadas em objetivas de 4X e 20X, respectivamente. As secções foram fotografadas com uma câmera digital Spot Color Insight acoplada a um microscópio Olympus BX-40. Um total de duas secções de decídua foi avaliado por rata. Utilizando o programa Image Pro Plus® versão 4.5, foram realizadas medições sobre a área total ocupada pela decídua em cortes histológicos corados com HE. O número de vasos sanguíneos e a área que ocupavam foram determinados em sete campos por decídua nas secções coradas por tricrômico de Masson.

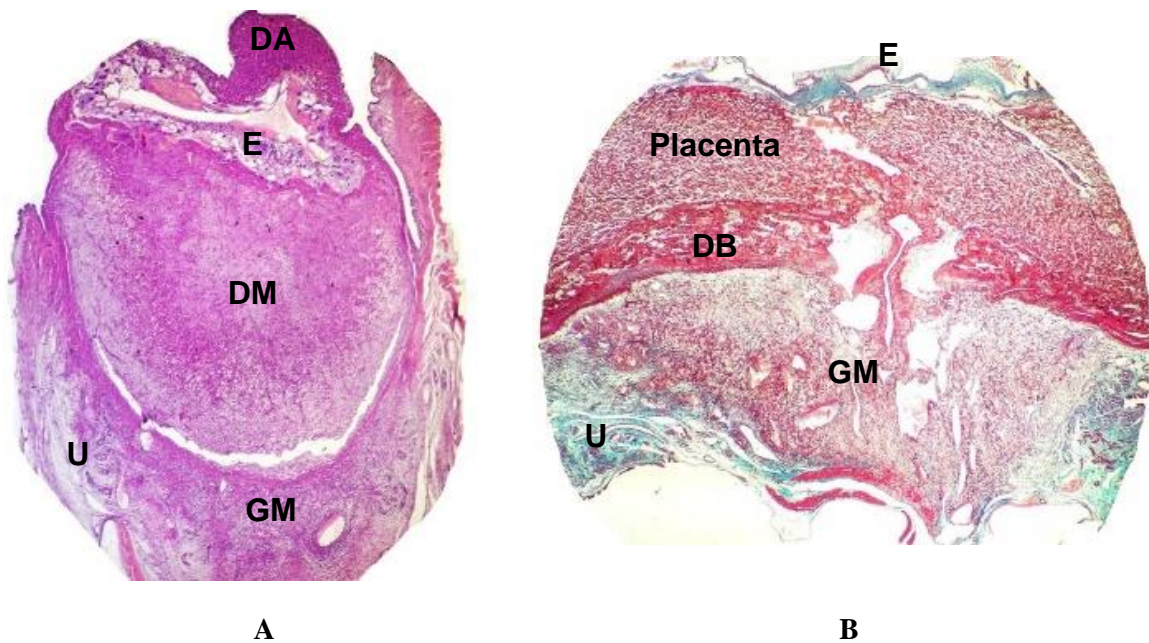


Figura 1. Fotomicrografia da região de Decídua A) aos 10 DG corado por HE e B) aos 14 DG corado por Tricrômico de Masson. Onde: E- embrião; DA- decídua antimesometrial; DM- decídua mesometrial; GM- glândula metrial; U- útero; DB- decídua basal.

#### 4.5. Imunoistoquímica

A técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase foi utilizada para a imunoistoquímica com recuperação de antígeno usando uma solução de recuperação a 98°C. As secções histológicas foram incubadas em uma câmara úmida durante a noite com o anticorpo primário e, em seguida, foram realizados os seguintes passos: bloqueio de peroxidase endógena, bloqueio com soro (Dako Protein Block Serum-Free Ready-To-Use, Carpinteira, CA, USA) e incubação com estreptavidina peroxidase, 30 minutos por etapa. Utilizou-se anticorpo primário anti-VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) a uma diluição de 1:100, e anti-Flk-1 (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-Tie2 (Sc-9026, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em diluições de 1:300 e 1:50, respectivamente. A incubação com anticorpo secundário foi realizada durante 45 minutos. Como cromógeno, utilizou-se a diaminobenzidina. As secções foram contra-coradas com hematoxilina. O controle negativo foi obtido substituindo o anticorpo primário por IgG (X0909, Dako, CA, EUA).

Avaliações descritivas e quantitativas da detecção imunoistoquímica de VEGF, Flk-1 e Tie-2 foram realizadas em duas secções de decídua e glândula metrial por rata para cada grupo. A decídua mesometrial foi dividida em regiões central e lateral aos 10 DG (Herington *et al.*, 2007). Esses fatores foram observados na decídua basal e na glândula metrial, formadas pela arteríola espiralada que adentra a glândula metrial na região central, a atravessa e dilata-se na decídua basal, sendo rodeada por leucócitos e células decíduais nas respectivas regiões, aos 14 DG e 19 DG (Croy, 1999). Para determinar a intensidade e a área de imunomarcção, as imagens foram obtidas utilizando uma câmara digital Spot Color Insight15 acoplada a um microscópio Olympus BX-40 com uma ampliação de 20X. A intensidade e a área de

imunomarcção foram determinadas utilizando o software ImageJ WCIF®. *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados foram analisados e expressos como intensidade (densidade integrada) da imunomarcção e área em pixels (Silva *et al.*, 2015).

#### 4.6. Análise estatística

O estudo utilizou um delineamento inteiramente casualizado. A ANOVA foi realizada e as médias e o desvio padrão foram obtidos para cada variável. As médias foram comparadas utilizando o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ .

### 5. Resultados

#### 5.1. Indução da disfunção tireoidiana

As ratas tratadas com PTU apresentaram letargia e níveis plasmáticos reduzidos de  $T_4$  e  $T_3$  livres em comparação com animais controle no tempo zero ( $T_4 P < 0,05$  e  $T_3 P < 0,01$ ) e a 19 DG ( $T_4 P < 0,001$ ;  $T_3 P < 0,05$ ), confirmando assim a indução do hipotireoidismo (Fig. 2A e 2B). Ao contrário, as ratas tratadas com  $T_4$  exibiram agressividade e níveis plasmáticos aumentados de  $T_4$  livre aos 0 DG e 19 DG ( $P < 0,001$ , 19 DG,  $P < 0,001$ , Fig. 2B). No entanto, os níveis de  $T_3$  livre não aumentaram significativamente no grupo de ratas tratadas com  $T_4$ .

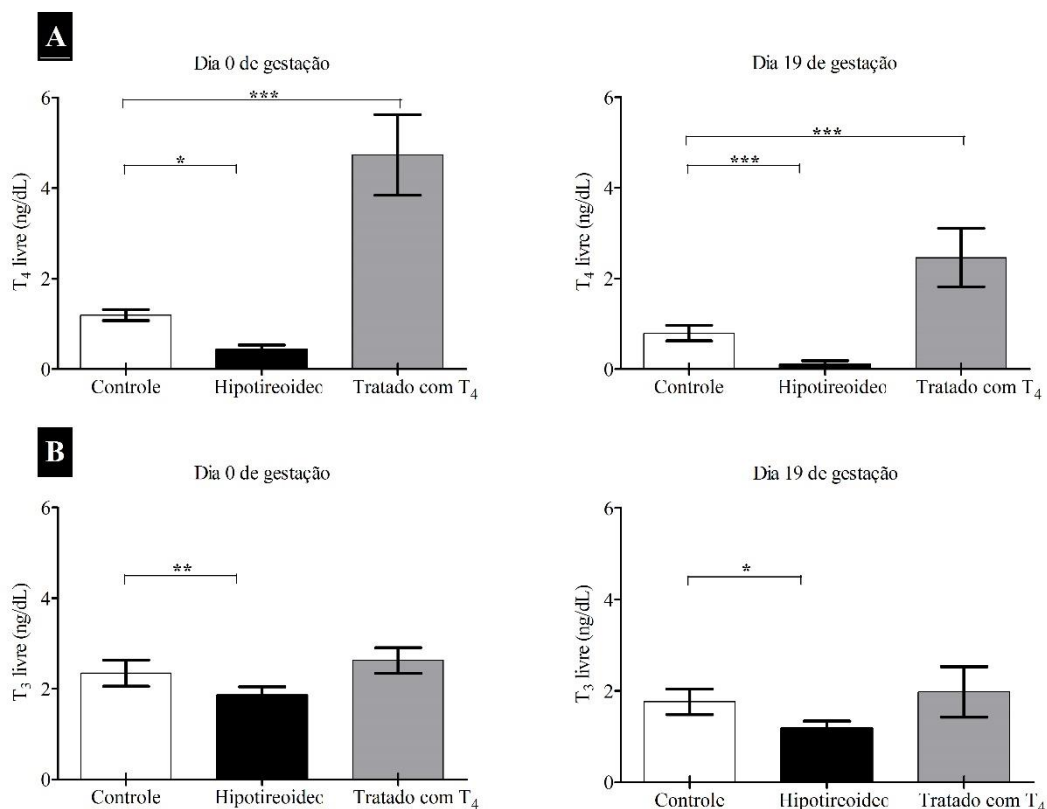




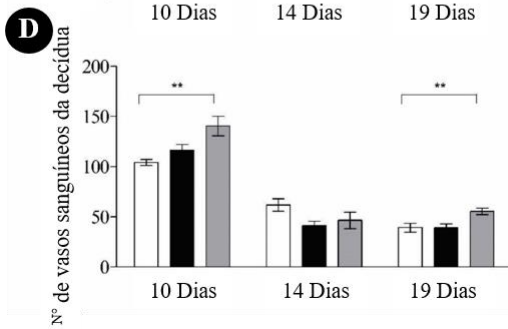
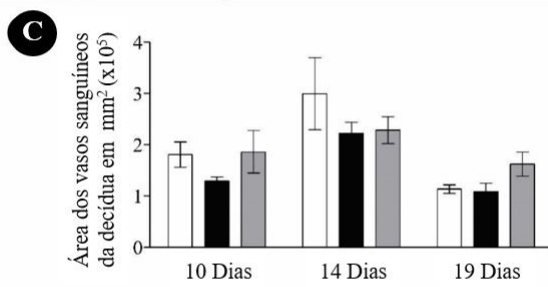
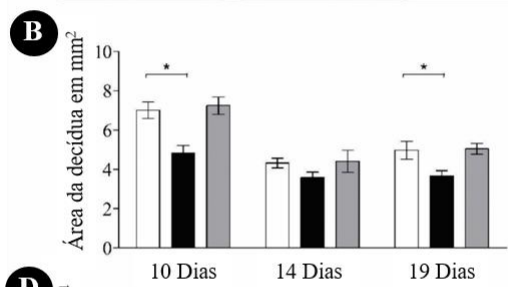
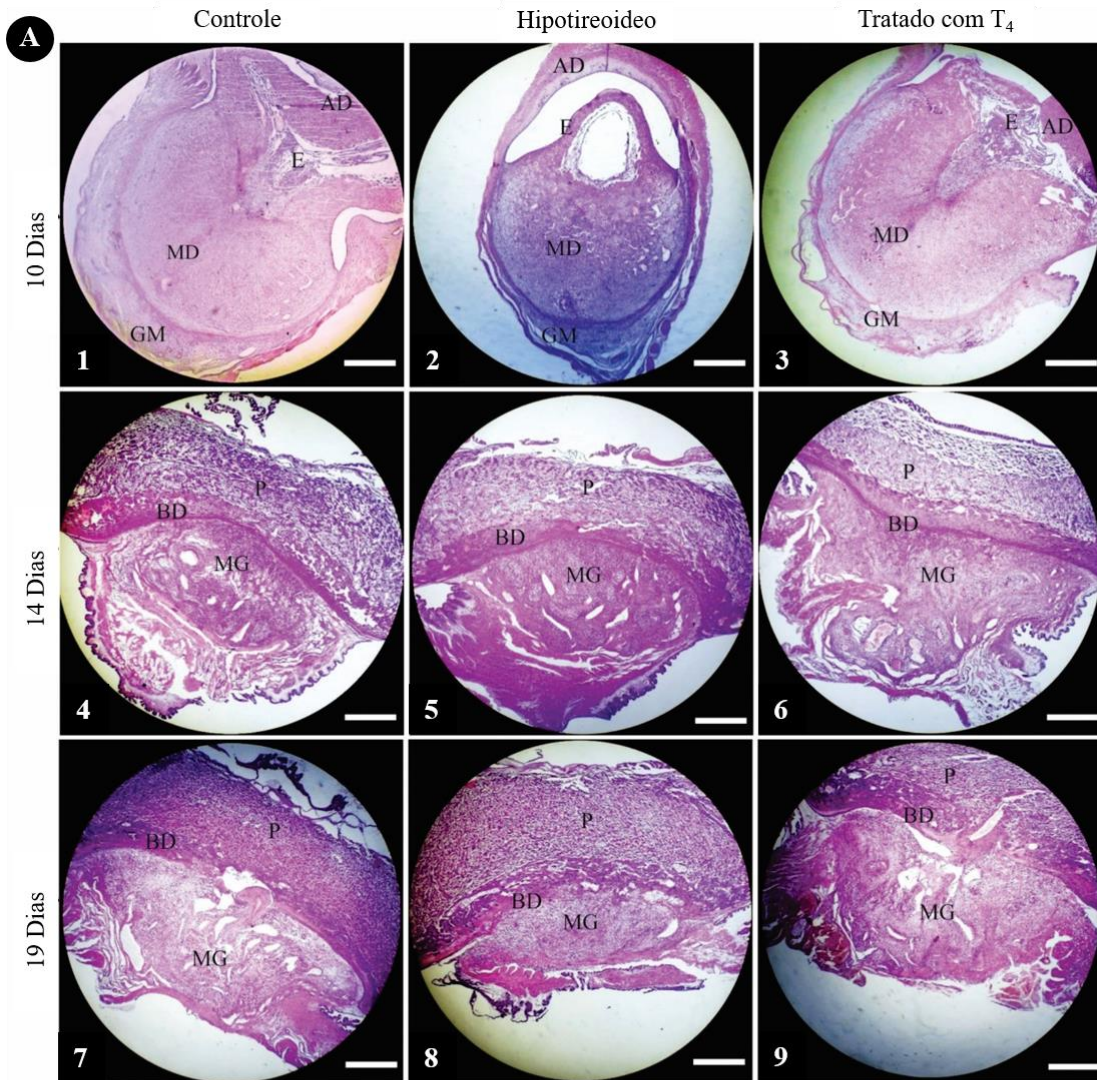
Figura 2. A e B. Níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livre (média ± DP) no plasma de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratadas com T<sub>4</sub> no 0 DG e 19 DG (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

## 5.2. Histomorfometria

Em todos os grupos aos 10 DG, a decídua exibiu uma região central com infiltração de células trofoblásticas cercadas por células decíduais caracterizadas por uma forma arredondada ou poliédrica com um citoplasma volumoso, finamente granular e eosinofílico. As células decíduais estavam por vezes justapostas. Ocasionalmente, algumas células uNKs foram observadas intercaladas com as células decíduais. As uNKs são caracterizadas por uma forma arredondada com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos e/ou basofílicos. Na região lateral da decídua, células mal diferenciadas, fusiformes ou estreladas podiam ser observadas com um citoplasma moderado, frouxamente organizadas. Esta região foi delimitada por uma delgada camada de músculo liso. Durante este período, a glândula metrial estava iniciando seu desenvolvimento com poucas uNKs em torno dos vasos sanguíneos. Nessa idade gestacional, o grupo hipotireoideo apresentou menor área de decídua em relação ao controle (Fig. 3A-1, B  $P < 0,05$ ). Neste grupo, não houve redução significativa no número de vasos sanguíneos ou na área ocupada pelos vasos (Fig. 3B e D). Por outro lado, no grupo tratado com T<sub>4</sub>, não houve diferença significativa na área da decídua, embora o número de vasos sanguíneos tenha sido significativamente maior em relação ao controle ( $P < 0,01$ , Fig. 3A-1, B, C e D).

Aos 14 DG em todos os grupos, a musculatura lisa entre o miometrio e a decídua basal estava presente na glândula metrial. As decíduas apresentaram predominância de células endometriais decidualizadas ovaladas à poliédricas, volumosas e com um citoplasma eosinofílico e finamente granulado com arranjo epitelióide. Entre estas células, havia numerosos vasos sanguíneos. Na região central da decídua, havia arteríolas de grande calibre que penetravam a glândula metrial, em torno da qual as células de glicogênio e o trofoblasto intersticial puderam ser observadas. Muitas uNKs estavam dispostas concêntricamente em torno de vasos sanguíneos de tamanhos variados. O trofoblasto endovascular estava alinhado, justaposto ou, por vezes, vagamente distribuído dentro da parede vascular onde substituiu as células endoteliais. Neste período de gestação, não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à área da decídua (Fig. 3A-4, -5 e -6 e 3B) ou ao número e a área ocupada pelos vasos sanguíneos (Fig. 3C e 3D).

Aos 19 DG, a decídua apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo fibroso e menos células decíduais. As glândulas metriais apresentaram uma área reduzida em comparação aos 14 DG, com aumento da quantidade de células de glicogênio e menos uNKs. Aos 19 DG no grupo hipotireoideo, semelhante aos 10 DG, observou-se também redução significativa da área de decídua em relação ao controle (Fig. 3A-7, -8 e 3B,  $P < 0,05$ ), sem alteração significativa no número ou na área ocupada pelos vasos sanguíneos ( $P < 0,05$ , Fig. 3C e 3D). No entanto, as ratas tratadas com T<sub>4</sub> tiveram aumento no número de vasos sanguíneos em comparação com o controle ( $P < 0,01$ , Fig. 3D).



□ Controle  
 ■ Hipotireoideo  
 ■ Tratado com T<sub>4</sub>

Figura 3. (A-1-9) Secções histológicas da interface materno-fetal dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. B) Área de decídua mesometrial dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. Redução da área de decídua no grupo hipotireoideo em relação ao controle aos 10 DG e 19 DG. C) Área ocupada por vasos sanguíneos na BD dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub> aos 10 DG, 14 DG e 19 DG. D) Número de vasos sanguíneos na BD dos grupos de controle, hipotireoideo e tratados em 10 DG, 14 DG e 19 DG. Aumento do número de vasos sanguíneos no BD do grupo tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo controle aos 10 DG e 19 DG (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ). (Hematoxilina-eosina, Bar = 1000  $\mu$ m) AD: decídua anti-mesometrial; E: embrião; BD: decídua basal; MG: glândula metrial; MD: decídua mesometrial; P: placenta.

### 5.3. A detecção imunoistoquímica de VEGF, Flk-1 e Tie-2

A expressão de VEGF, Flk-1 e Tie-2 pôde ser detectada por imunoistoquímica na decídua e glândula metrial de células deciduais, trofoblasto intersticial e endovascular, uNK, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. A Expressão foi observada em cada um dos grupos experimentais. A área e a intensidade de expressão variaram de acordo com os períodos e diferiram entre os grupos.

Aos 10 DG, o hipotireoidismo aumentou a área e a intensidade da imunomarcaçãõ do VEGF na área lateral da decídua em comparação com o grupo controle ( $P < 0,05$ , Fig. 4A). A imunomarcaçãõ pode ser observada em células deciduais nas regiões central e lateral, bem como em uNK, macrófagos intersticiais, células endoteliais e trofoblastos intersticiais. Na glândula metrial, que ainda está em desenvolvimento durante este período, a imunomarcaçãõ citoplasmática de VEGF foi visualizada em uNK, macrófagos intersticiais, células endoteliais e trofoblastos intersticiais. Além disso, no grupo hipotireoideo, a intensidade de imunomarcaçãõ do VEGF na decídua e na glândula metrial aos 14 DG foi significativamente maior em comparação ao grupo controle ( $P < 0,01$ , Fig. 4B). A detecçãõ imunoistoquímica aumentada de VEGF aos 10 DG e 14 DG no grupo hipotireoideo foi principalmente observada em células deciduais e uNK, apesar de também ter sido observada em outros tipos de células. De 10 para os 14 DG, a expressãõ foi observada em todos os grupos experimentais, mas tornou-se significativamente diminuída na intensidade bem como na área de imunomarcaçãõ de VEGF ( $P < 0,001$ , Fig. 4D).

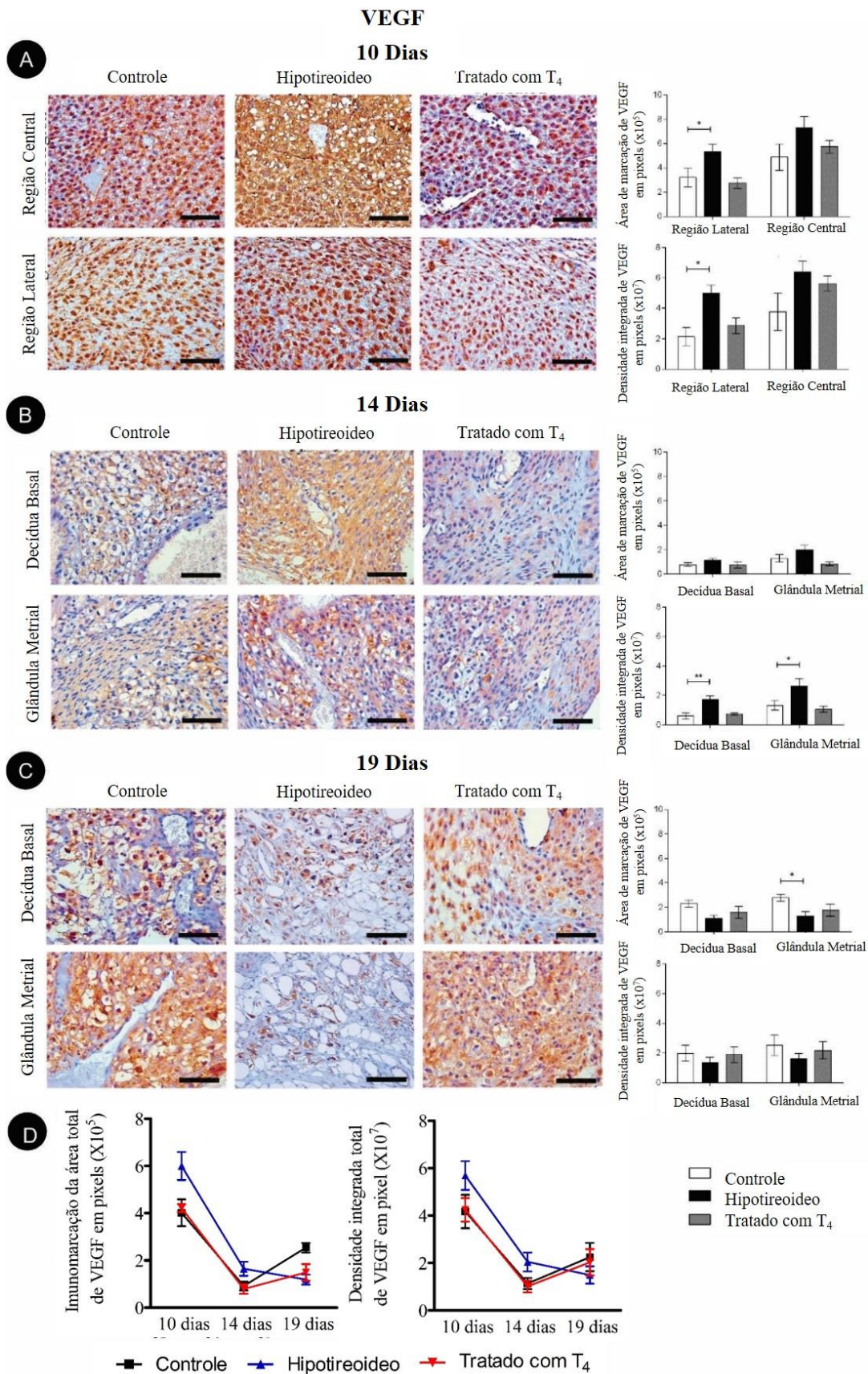


Figura 4. Expressão de VEGF na decídua de ratas dos grupos controle, hipotiroideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 10 DG com área aumentada e intensidade de imunomarcção de VEGF na região lateral da decídua do grupo hipotiroideo em comparação com o grupo de controle; (B) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 14 DG com aumento da intensidade de imunomarcção de VEGF na decídua e glândula metrial no grupo hipotiroideo em comparação com o grupo de controle; (C) Detecção imunoistoquímica de VEGF na decídua aos 19 DG com redução da área de imunomarcção de VEGF na glândula metrial no grupo hipotiroideo em comparação com o grupo controle (\*  $P < 0,05$ ), estreptavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, 200  $\mu\text{m}$ ); (D) Intensidade e área de imunomarcção de VEGF na decídua de ratas 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo.

Contudo, aos 19 DG, observou-se uma área de imunomarcção reduzida de VEGF nas glândulas metriais de ratas, do grupo hipotiroideo em comparação com o grupo controle ( $P < 0,05$ , Fig. 4C). A imunomarcção foi mais evidente em uNKs e macrófagos, predominantemente em áreas perivasculares. Nesta idade gestacional, bem como em outros períodos, as ratas tratadas com T<sub>4</sub> não mostraram diferenças significativas na expressão de VEGF na decídua em comparação ao grupo controle ( $P > 0,05$ , Fig. 4A, B e C). A imunomarcção de VEGF apenas aumentou no grupo controle aos 14 DG e 19 DG ( $P < 0,01$ ), isto é, não houve diferença significativa entre os períodos nos grupos de ratas hipotiroideas e tratadas com T<sub>4</sub> (Fig. 4D).

Em relação ao receptor de VEGF, Flk-1, as ratas tratadas com T<sub>4</sub> mostraram aumento na área e intensidade de imunomarcção na região central da decídua aos 10 DG em comparação com as ratas de controle ( $P < 0,05$ , Fig. 5A). A imunomarcção foi citoplasmática e observada em células decíduais, células endoteliais, macrófagos intersticiais e uNKs em cada um dos grupos experimentais. Contudo, a imunomarcção foi mais intensa nas uNKs. A imunomarcção de Flk-1 foi predominantemente observada no citoplasma de uNKs aos 14 DG e foi observada intensidade aumentada de imunomarcção na decídua e na glândula metrial do grupo hipotiroideo em comparação com o grupo controle ( $P < 0,05$ , Fig. 5B). No entanto, tanto o grupo hipotiroideo quanto o tratado com T<sub>4</sub> exibiram detecção imunoistoquímica reduzida de Flk-1 na decídua e na glândula metrial em comparação com as ratas do grupo controle aos 19 DG ( $P < 0,05$ , Fig. 5C). Quando os períodos de gestação foram comparados dentro de cada grupo, observou-se que houve menos imunomarcção de Flk-1 em ambos os grupos de tratamento aos 14 DG e 19 DG (hipotireoidismo,  $P < 0,001$ ; tratado com T<sub>4</sub>,  $P < 0,05$ ), o que não ocorreu no grupo controle (Fig. 5D). Além disso, observou-se aumento da área ( $P < 0,05$ ) e da densidade ( $P < 0,01$ ) de imunomarcção no grupo hipotiroideo aos 10 DG e 14 DG, o que não ocorreu nos grupos controle e tratados com T<sub>4</sub> (Fig. 5D).

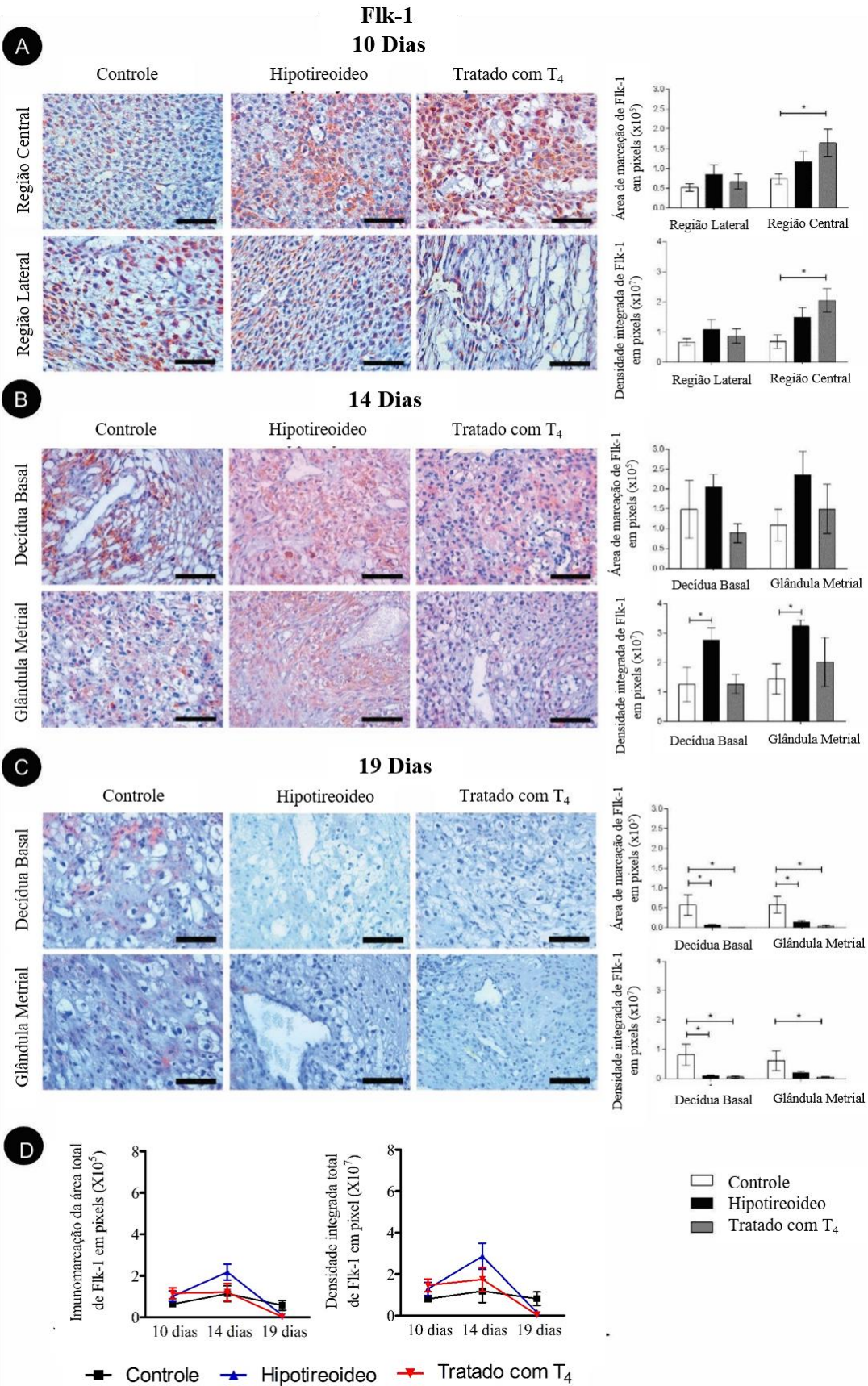


Figura 5. Expressão de Flk-1 na decídua de ratas do grupo controle, hipotireoide e tratadas com T<sub>4</sub>. (A) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 10 DG com aumento na intensidade e área de imunomarcção de Flk-1 na decídua mesometrial na região central no grupo tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo controle; (B) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 14 DG com intensidade de imunomarcção aumentada de Flk-1 na decídua basal e glândula metrial no grupo hipotireoide em comparação ao grupo controle; (C) Detecção imunoistoquímica de Flk-1 na decídua aos 19 DG com redução na intensidade e área de imunomarcção de Flk-1 na decídua basal e glândula metrial nos grupos hipotireoide e tratado com T<sub>4</sub> em comparação ao grupo controle (\* $P < 0,05$ ; estreptavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, Bar = 200  $\mu\text{m}$ ); (D) Intensidade de imunomarcção e área de expressão de Flk-1 na decídua de ratas aos 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo.

Em relação ao Tie-2 (receptor de angiopoietina), a imunomarcção citoplasmática foi observada em células decíduais, células endoteliais, macrófagos intersticiais e uNKs em todos os grupos experimentais. A imunomarcção foi mais intensa em células decíduais. Houve aumento na intensidade da imunomarcção na região lateral da decídua mesometrial no hipotireoidismo, em comparação com o grupo controle aos 10 DG ( $P < 0,05$ , Fig. 6A). Aos 14 DG, não houve diferença significativa entre os grupos. Aos 19 DG, ratas hipotiroideas apresentaram aumento significativo na área e intensidade de expressão de Tie-2, predominantemente em células decíduais da decídua basal e da glândula metrial em relação as ratas controle ( $P < 0,01$ , Fig. 6B). As ratas tratadas com T<sub>4</sub> não apresentaram diferenças na imunomarcção de Tie-2 na decídua em comparação com ratas controle em todos os períodos gestacionais ( $P > 0,05$ , Fig. 6A, B e C). Comparando os períodos de gestação dentro de cada grupo, observamos que de 10 DG para 19 DG e de 14 DG para 19 DG, houve redução acentuada na imunomarcção de Tie-2 no grupo controle ( $P < 0,05$ ), hipotireoide ( $P < 0,001$ ), e grupo tratado com T<sub>4</sub> ( $P < 0,001$ ) (Fig. 6D). Entre 10 DG e 14 DG, a área de imunomarcção de Tie-2 foi apenas significativamente reduzida no grupo hipotireoide ( $P < 0,001$ , Fig. 6D).

## Tie-2

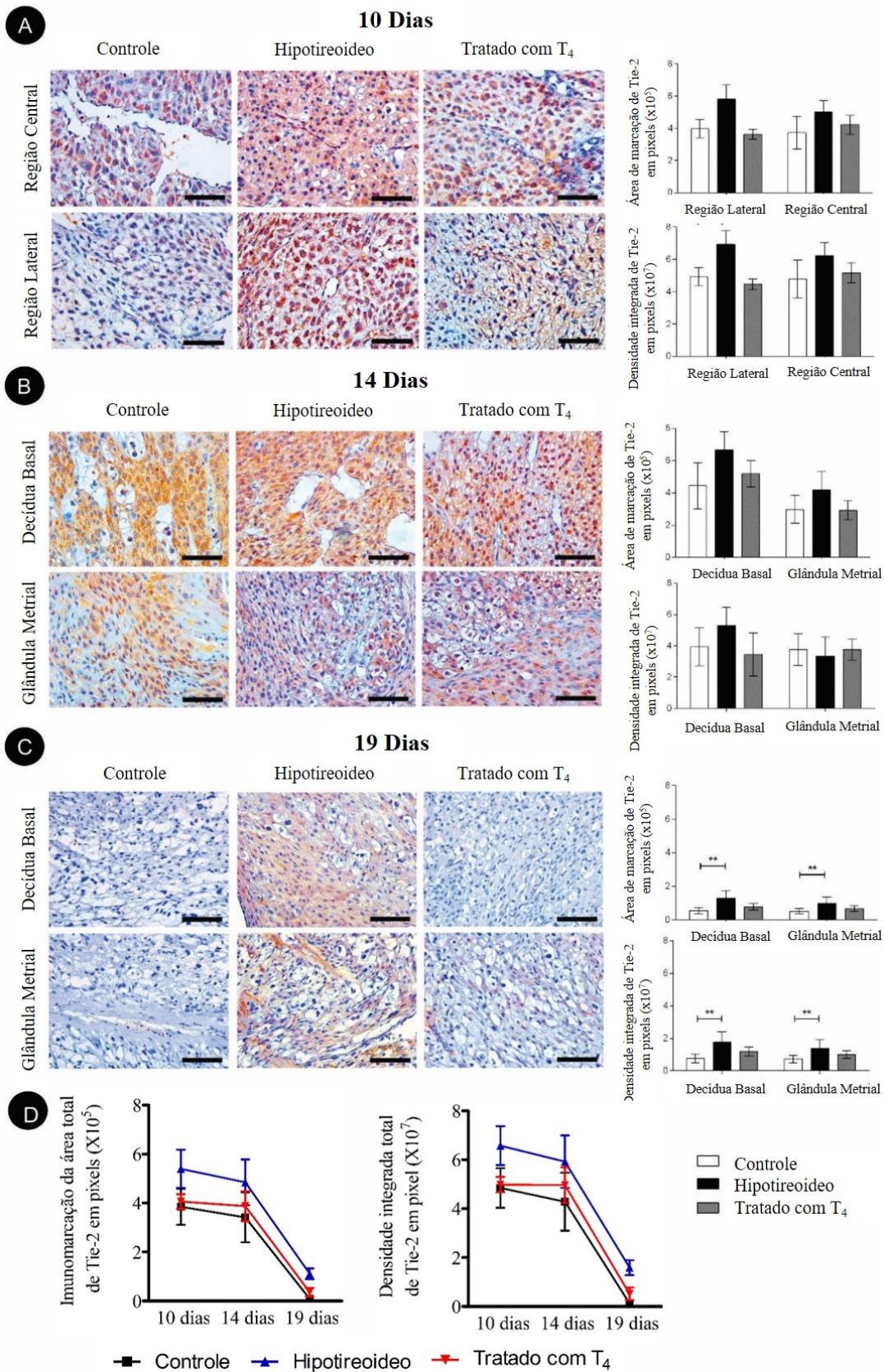




Figura 6. Expressão de Tie-2 na decídua de ratas do grupo controle, hipotireoideo e tratadas com T<sub>4</sub>. (A) Detecção imunoistoquímica de Tie-2 na decídua aos 10 DG com intensidade de imunomarcção Tie-2 aumentada na região lateral da decídua mesometrial do grupo hipotireoideo em comparação ao grupo controle; (B) Detecção imunoistoquímica de Tie-2 na decídua aos 14 DG não houve alterações significativas entre os grupos; (C) Detecção imunoistoquímica de Tie-2 na decídua aos 19 DG com aumento da intensidade e área de imunomarcção Tie-2 na decídua basal e glândula metrial do grupo hipotireoideo em comparação com o grupo controle (\*  $P < 0,05$ ; estrepavidina-biotina-peroxidase contracorado com hematoxilina, Bar = 200  $\mu\text{m}$ ); (D) Intensidade de imunomarcção e área de expressão de Tie-2 na decídua de ratas aos 10 DG, 14 DG e 19 DG, são observadas diferenças entre os períodos em cada grupo.

Tabela 1. Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T<sub>4</sub> na expressão de fatores angiogênicos, número de vasos/campo e área de decídua na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle. D- decídua; RL- região lateral; RC- região central; DB- decídua basal; GM- glândula metrial.

| Expressão Imunoistoquímica, número de vasos/campo e área de decídua |           |               |    |         |    |         |    |                            |    |         |    |         |    |
|---|-----------|---------------|----|---------|----|---------|----|----------------------------|----|---------|----|---------|----|
| Fatores Angiogênicos  |           | Hipotireoideo |    |         |    |         |    | Tratado com T <sub>4</sub> |    |         |    |         |    |
|   |           | 10 Dias       |    | 14 Dias |    | 19 Dias |    | 10 Dias                    |    | 14 Dias |    | 19 Dias |    |
|   |           | RL            | RC | DB      | GM | DB      | GM | RL                         | RC | DB      | GM | DB      | GM |
| VEGF  | Área      | ↑             | -  | -       | -  | -       | ↓  | -                          | -  | -       | -  | -       | -  |
|   | Densidade | ↑             | -  | ↑       | -  | -       | -  | -                          | -  | -       | -  | -       | -  |
| Flk-1   | Área      | -             | -  | -       | -  | ↓       | ↓  | -                          | ↑  | -       | -  | ↓       | ↓  |
|   | Densidade | -             | -  | ↑       | ↑  | ↓       | ↓  | -                          | ↑  | -       | -  | ↓       | ↓  |
| Tie-2   | Área      | -             | -  | -       | -  | ↑       | ↑  | -                          | -  | -       | -  | -       | -  |
|   | Densidade | -             | -  | -       | -  | ↑       | ↑  | -                          | -  | -       | -  | -       | -  |
| Nº de vasos/campo   |           | -             |    | -       |    | -       |    | ↑                          |    | -       |    | ↑       |    |
| Área de decídua   |           | ↓             |    | -       |    | ↓       |    | -                          |    | -       |    | -       |    |

↑ aumento significativo da expressão imunoistoquímica;

↓ redução significativa da expressão imunoistoquímica;

- não houve diferença significativa na detecção imunoistoquímica

## 6. Discussão

Nossos resultados revelaram, pela primeira vez, que a disfunção tireoidiana afetou a decidualização e a angiogênese na decídua e na glândula metrial de ratas no meio e final da gestação de forma distinta e de acordo com o período gestacional.

No presente estudo, houve redução dos níveis séricos de  $T_3$  e  $T_4$  livres após a administração de PTU. Isto ocorreu porque o PTU liga-se à peroxidase da tireóide e inibe a conversão de iodo em iodo. Outra ação do PTU é a de bloquear a conversão de  $T_4$  em  $T_3$ , a forma ativa do hormônio nos tecidos alvo, inibindo a enzima 5'-desiodinase (Chakraborty *et al.*, 2012). Assim, o PTU inibe de forma eficaz a síntese de hormônios tireoidianos (Holsberger *et al.*, 2003; Jahnke *et al.*, 2004; Chakraborty *et al.*, 2012). No entanto, nas ratas tratadas com  $T_4$  houve aumento do  $T_4$  livre sem aumento concomitante de  $T_3$  livre, mas o aumento de  $T_4$  esteve associado à excitabilidade dos animais. De acordo com Hennemann (2006), o hipertireoidismo caracteriza-se pelo aumento da síntese de  $T_3$  e  $T_4$  pela tireoide com consequente exacerbação dos sinais clínicos. A tireotoxicose envolve o aumento dos hormônios tireoidianos resultantes de muitas outras causas que incluem efeitos iatrogênicos associados a alterações clínicas e/ou bioquímicas (Hennemann, 2006). Portanto, não é surpreendente que o grupo de ratas tratadas com  $T_4$  exibisse tireotoxicose. Neste caso, o aumento de  $T_4$  sem aumento de  $T_3$  pode ter ocorrido devido à conversão de  $T_4$  em  $T_3$ , que ocorre predominantemente no citoplasma das células-alvo pelas ações das deiodinases (Gereben *et al.*, 2008; Zanatta *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014). Outra hipótese é a de que a  $T_3$  foi rapidamente metabolizada, não havendo tempo para aumentar seus níveis séricos. Isso ocorre porque em mulheres gestantes, o metabolismo é mais rápido, juntamente com o aumento do débito cardíaco, do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (Frederiksen, 2001).

A redução na área da decídua causada pelo hipotireoidismo pode ocorrer devido ao atraso na diferenciação de fibroblastos intersticiais para células deciduais na ausência de estímulo trófico por hormônios tireoidianos (Kennedy e Doktorcik, 1988; Galton *et al.*, 2001). A decídua é uma área altamente especializada que se forma durante a gestação e inicia sua regressão durante o terço médio até o parto, estendendo-se pouco após este. A redução nessa área pode afetar o desenvolvimento adequado da placenta (Ashkar e Croy, 1999). Essa alteração pode estar envolvida na gênese do baixo peso ao nascimento e das alterações placentárias observadas em ratas com hipotireoidismo, tratadas com as mesmas doses de PTU utilizadas neste estudo (Silva *et al.*, 2012).

Curiosamente, apesar da redução na área da decídua, o hipotireoidismo aumentou a expressão de VEGF e Tie-2 na região lateral da decídua mesometrial durante o terço médio da gestação sem alterar o número de vasos sanguíneos. Sabe-se que o processo de neovascularização e remodelamento vascular na interface materno-fetal ocorre intensamente durante o terço médio de gestação para dar suporte sanguíneo ao feto em desenvolvimento e permitir a adequada formação da placenta (Plaisier, 2011). Tie-2 é o receptor das angiopoietinas 1 e 2, que exercem ações antagonistas. Ang-1 promove a estabilidade vascular e aumenta o diâmetro dos vasos sanguíneos. Contudo, a expressão de Ang-2 pode ser induzida por hipóxia, reduz a adesão entre as células endoteliais e aumenta o diâmetro vascular para produzir uma vasculatura mais

complexa e aumentar o número de ramos vasculares (Plaisier, 2011). Assim, com base no fato de que Tie-2, quando estimulada por Ang-1, promove a estabilidade vascular (Plaisier, 2011), nossa hipótese é que seu aumento aos 10 DG em ratas hipotireoideas possa atrasar o remodelamento vascular.

O remodelamento vascular é caracterizado pela modificação dos vasos sanguíneos na região da decídua mesometrial (Pijnenborg *et al.*, 1980). A arteríola espiral uterina passa de vasos finos com camada muscular proeminente para vasos dilatados, que são flácidos e não têm controle vasomotor materno (Pijnenborg *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2009). Este processo é acompanhado pela perda de músculos lisos nas artérias e células endoteliais, que são substituídas por trofoblastos extravilosos e são envoltas por uma matriz fibrinoide amorfa (Pijnenborg *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). Um atraso no remodelamento vascular na região da decídua pode ocorrer no início da gestação e está associado com hipóxia e estresse placentário (Jauniaux *et al.*, 2000; Plaisier *et al.*, 2000; Plaisier, 2011). Estudos anteriores demonstraram que a hipóxia estimula a expressão de VEGF induzida pela expressão do fator indutor de hipóxia 1a (HIF1 $\alpha$ ) (Adelman e Gertssenstein, 2000; Plaisier, 2011). Durante o início da gestação, há períodos de hipóxia com aumento da expressão de VEGF aos 10 DG. Após esse período, 14 DG, há uma redução na expressão do VEGF em todos os grupos experimentais, como observamos neste estudo, o que pode ser explicado pela redução da hipóxia, que também ocorre fisiologicamente (Plaisier, 2011). Além disso, aos 14 DG, a decídua inicia sua regressão (Picut *et al.*, 2009). Outro fator importante observado por Silva *et al.* (2014) foi a redução da invasão trofoblástica da interface materno-fetal ocorrida em ratas hipotireoideas. A redução da migração trofoblástica intra-uterina resulta em remodelamento vascular diminuído, hipóxia e estresse placentário (Lala e Chakraborty 2003; Plaisier, 2011; James *et al.*, 2012). É importante destacar que as células decíduais promovem um ambiente uterino que é resistente ao estresse oxidativo (Adelman *et al.*, 2000; Red-Horse e Zhou, 2004; Plaisier, 2011). As alterações nas populações de células decíduais e o padrão de expressão dos genes estão relacionados com a redução da área de decídua (Ashkar e Croy, 1999), como observamos no grupo hipotiroideo. Assim, uma área decidual reduzida também pode causar hipóxia e estresse placentário. Por conseguinte, foi sugerido que um ambiente de hipóxia pode promover não só a expressão aumentada de VEGF aos 10 DG em ratas hipotiroideas, mas também a expressão de VEGF e do seu receptor Flk-1 aos 14 DG. Isto ocorre porque a expressão de Flk-1 é auto-regulada e estimulada pelo VEGF (Plaisier *et al.*, 2007; Douglas *et al.*, 2009; Plaisier, 2011; Kim *et al.*, 2013).

Outra hipótese para explicar o aumento na expressão de VEGF aos 10 DG e 14 DG em células decíduais de animais hipotiroideos é que a retenção desta proteína no citoplasma ocorre devido a uma falha no mecanismo de liberação. Ratas com hipotireoidismo têm um defeito na formação do citoesqueleto em neurônios e astrócitos, o que provoca a retenção de produtos de síntese proteica no citoplasma dessas células (Cheng *et al.*, 2010) e pode ter ocorrido durante o desenvolvimento da decídua. No entanto, mais pesquisas serão necessárias para confirmar esta hipótese.

Embora não tenha sido observado aumento da expressão de VEGF nas ratas tratadas com T<sub>4</sub>, houve aumento na expressão de Flk-1 aos 10 DG. O aumento na expressão de Flk-1 pode resultar em maior atividade tanto de PlGF quanto de VEGF, o que favorece o aumento da permeabilidade vascular e da formação de novos vasos (Plaisier *et al.*, 2007; Vasilopoulou *et al.*, 2014). É importante notar que as ratas com excesso de T<sub>4</sub> exibiram maior número de vasos sanguíneos na região de decídua aos 10 DG e 19 DG. É possível que o aumento da expressão de Flk-1 em células decíduais possa resultar na estimulação parácrina de VEGF intersticial sintetizado pelas células trofoblásticas, assim como Silva *et al.* (2015) demonstraram o aumento da expressão de VEGF e PlGF em células trofoblásticas do disco placentário de ratas tratadas com T<sub>4</sub> aos 10 DG. O VEGF em maiores níveis atua em seu receptor no terço médio da gestação para promover suporte hematotrófico ao feto (Reynolds *et al.*, 2010). Isto poderia explicar parcialmente o porquê de haver aumento do número de fetos viáveis com peso uniforme em ratas gestantes hipertiroideas (Freitas *et al.*, 2007).

A redução de VEGF e Flk-1 na decídua do grupo hipotiroideo aos 19 DG corrobora com os achados de Silva *et al.* (2015) que descreveram a redução da expressão de VEGF no disco placentário aos 19 DG, além do aumento da expressão gênica da proteína relacionada à proliferina (rPlf), um fator anti-angiogênico. Acredita-se que a baixa expressão desses fatores também pode favorecer os baixos pesos placentários e fetais, que foram encontrados nesses indivíduos (Smith *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015), uma vez que o aumento do peso corporal do feto ocorre no terço final da gestação (Baker *et al.*, 1993). No entanto, a maior expressão de Tie-2 em animais hipotiroideos aos 19 DG também pode promover atraso no parto, o que foi observado em animais com hipotireoidismo (Hapon *et al.*, 2003; Pickard *et al.*, 2003). Ao final da gestação, há redução na expressão de Ang-2. Além disso, o processo de regressão vascular precoce na interface materno-fetal é necessário para a ocorrência do parto (Yuan e Lin, 2004). Como a Ang-2 promove a proteção da microvasculatura e atrasa a apoptose das células endoteliais (Yuan e Lin, 2004), é provável que o aumento da sua atividade na decídua ocorra pelo aumento da expressão de Tie-2 em animais hipotiroideos e resulte no atraso da regressão vascular ao final da gestação, conseqüentemente atrasando o parto.

No entanto, aos 19 DG, as ratas tratadas com T<sub>4</sub> também exibiram expressão reduzida de VEGF e Flk-1 na decídua e na glândula metrial. Um resultado semelhante também foi encontrado no disco placentário de ratas tratadas com T<sub>4</sub> no mesmo período gestacional (Silva *et al.*, 2015). Em condições normais, a expressão de VEGF e Flk-1 é reduzida durante a gestação (Jackson *et al.*, 1994), como observamos neste estudo. Além disso, estudos anteriores mostraram que a redução da expressão do VEGF placentário abaixo dos níveis fisiológicos está relacionada ao nascimento prematuro em humanos (Kramer *et al.*, 2005; Andraweera *et al.*, 2012). Uma hipótese é que a redução de VEGF e Flk-1 na decídua e na glândula metrial de ratas com excesso de T<sub>4</sub> seja um dos vários mecanismos que podem operar para desencadear o parto precoce em ratas hipertiroideas (Navas *et al.*, 2011).

## **7. Conclusão**

Em conclusão, o hipotireoidismo reduz a área da decídua e aumenta a expressão de VEGF, Tie-2 e Flk-1. O excesso de T<sub>4</sub> promove a angiogênese decidual ao aumentar o número de vasos na decídua associado ao aumento da expressão de Flk-1.

## CAPÍTULO 3

### **Efeito dos hormônios tireoidianos no perfil de expressão espaço-temporal de mediadores imunológicos e da população de células natural killers na decídua e glândula metrial de ratas**

#### **1. Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil imunistoquímico e gênico de mediadores inflamatórios e a população de células *Natural Killer* uterinas (uNKs) na região de decídua e glândula metrial de ratas com hipotireoidismo e tratadas com L-tiroxina (T<sub>4</sub>). Um total de 108 ratas Wistar adultas foi distribuído igualmente em três grupos experimentais, hipotireoideo, tratado com T<sub>4</sub> e controle. O hipotireoidismo foi induzido com doses diárias de propiltiouracil e controle recebeu água destilada como placebo. As ratas foram eutanasiadas aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG. Avaliou-se a detecção imunistoquímica de interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), do fator inibidor de migração (MIF), da interleucina 15 (IL15), da oxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a marcação com Lectina DBA para evidenciação das células uNK DBA<sup>+</sup> na decídua. Além disso avaliou-se a expressão gênica de *Ifny* e *iNos* por RT-PCR em tempo real. Os dados foram analisados usando o teste *Student-Newman-Keuls* (SNK). A expressão dos fatores pró e anti-inflamatórios estudados oscilou ao longo da gestação em todos os grupos tanto na decídua quanto na glândula metrial. O hipotireoidismo aumentou a expressão proteica de iNOS aos 7 dias, IL15 e MIF aos 10 e 12 dias, IFN $\gamma$  e MIF aos 14 DG na decídua e/ou glândula metrial e dos transcritos gênicos para *iNos* aos 12 e 19 dias e para *Ifny* aos 14 DG. Além disso, o hipotireoidismo reduziu a expressão proteica dos fatores pró-inflamatórios MIF e Lectina DBA, aos 07 dias, Lectina DBA aos 10 e 14 DG e IFN $\gamma$ , aos 12 dias, e do transcrito gênico para *Ifny* aos 10 e 19 DG. O hipotireoidismo também reduziu a expressão proteica do fator anti-inflamatório iNOS aos 12, 14 e 19 DG e reduziu seus transcritos gênicos aos 10 e 14 DG. Os grupos tratados com T<sub>4</sub> apresentaram aumento de expressão proteica de IFN $\gamma$ , IL15 e MIF aos 7 dias, IL15, iNOS e MIF aos 10 dias, MIF e Lectina DBA aos 12 dias na glândula metrial, IFN $\gamma$  e MIF na decídua basal aos 14 DG. Além disso, o tratamento com T<sub>4</sub> reduziu a expressão proteica de Lectina DBA aos 7 e 10 dias, IFN $\gamma$  aos 12 e 19 dias, IL15 aos 12 e 14 dias e iNOS aos 12 e 14 DG. Conclui-se que tanto o hipotireoidismo quanto o tratamento com tiroxina alteram o perfil de expressão espaço-temporal dos fatores imunológicos da decídua e da glândula metrial ao longo da gestação. A redução dos fatores pró-inflamatórios IFN $\gamma$  e interleucina 15 é mais predominante no grupo tratado com T<sub>4</sub>, enquanto o hipotireoidismo compromete o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal, uma vez que a redução do fator anti-inflamatório iNOS e das células uNK DBA<sup>+</sup> é principalmente evidenciada neste grupo. Com relação ao MIF, ambos os tratamentos elevam sua expressão dos 10 aos 14 DG.

## 2. Abstract

The goal of this study was to evaluate the immunohistochemical and gene expression of inflammatory mediators and immunological activity of uterine Natural Killer cells (uNKs) in the decidua region of rats with hypothyroidism and treated with L-thyroxine (T<sub>4</sub>). A total of 108 adult Wistar rats were equally distributed in three experimental groups, hypothyroid, T<sub>4</sub>-treated and control. Hypothyroidism was induced with daily doses of propylthiouracil and control rats received distilled water as placebo. The rats were euthanized at 7, 10, 12, 14 and 19 days of gestation. Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), migration inhibitory factor (MIF), interleukin 15 (IL15), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and DBA-Lectin labeling for evidence of uNK DBA<sup>+</sup> cells in decidua. In addition, genetic expression of *Ifn $\gamma$*  and *iNos* by real-time RT-PCR were evaluated. Data were analyzed using the Student-Newman-Keuls (SNK) test. The expression of pro and anti-inflammatory factors oscillated throughout the gestation in all the groups both in the decidua and in the metrial gland. Hypothyroidism increased protein expression of iNOS at 7 days, IL15 and MIF at 10 and 12 days, IFN $\gamma$  and MIF at 14 DG in the decidua and/or metrial gland and the gene transcripts for iNOS at 12 and 19 days and for IFN $\gamma$  at 14 DG. In addition, hypothyroidism reduced the protein expression of the proinflammatory factors MIF and DBA-Lectin at 7 days, DBA-Lectin at 10 and 14 DG and IFN $\gamma$  at 12 days, and from the gene transcript to *Ifn $\gamma$*  at 10 and 19 DGs. Hypothyroidism also reduced the protein expression of the anti-inflammatory factor iNOS at 12, 14 and 19 DG and reduced its gene transcripts at 10 and 14 DGs. The T<sub>4</sub>-treated groups presented increased protein expression of IFN $\gamma$ , IL15 and MIF at 7 days, IL15, iNOS and MIF at 10 days, MIF and DBA-Lectin at 12 days in the metrial gland, IFN $\gamma$  and MIF in the basal decidua at 14 DG. In addition, T<sub>4</sub>treatment reduced the protein expression of DBA-Lectin at 7 and 10 days, IFN $\gamma$  at 12 and 19 days, IL15 at 12 and 14 days and iNOS at 12 and 14 DG. It is concluded that both hypothyroidism and T<sub>4</sub>-treatment alter the spatiotemporal expression profile of the immunological factors of the decidua and the metrial gland throughout gestation. The reduction of the proinflammatory factors IFN $\gamma$  and IL15 is more predominant in the group treated with T<sub>4</sub>, whereas hypothyroidism compromises the development of an anti-inflammatory environment at the maternal-fetal interface, since a reduction of the antiinflammatory factor iNOS and the cells uNK DBA<sup>+</sup> is mainly evidenced in this group. Regarding MIF, both treatments increase their expression from 10 to 14 days of gestation.

## 3. Introdução

Na gestação, o processo de decidualização é crucial no estabelecimento da interface materno-fetal. Isso porque a decídua promove a troca seletiva de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto (Gu *et al.*, 1994a, b; Plaisier, 2011; Cha *et al.*, 2012) e tem um ambiente imunológico singular que permite a permanência do embrião/feto semi-alogênico em íntimo contato com o útero (Gellersen *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2010; Erlebacher, 2013). Portanto, para o sucesso da gestação é fundamental que haja uma interação fisiologicamente coordenada entre a placenta e o útero (Collins *et al.*, 2009) que será orquestrada por hormônios, dentre os quais os hormônios tireoidianos (Poppe *et al.*, 2003; Kilby *et al.*, 2005; Poppe *et al.*, 2008; Twig *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Silva e Serakides, 2016). Alterações séricas destes hormônios durante a gestação têm resultado em aborto, natimortalidade e restrição do crescimento intra-uterino tanto



na mulher como nas espécies de animais domésticos (Coulam, 2000; Choksi *et al.*, 2003; Malassiné *et al.*, 2003; Toder *et al.*, 2003; Torry *et al.*, 2004; Redmer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Vonnahme *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012).

Durante a decidualização, as células *Natural Killer* uterinas (uNKs) se infiltram no endométrio, a partir do sétimo para oitavo dias de gestação, para coordenar o remodelamento vascular e influenciar o perfil imunológico na interface materno-fetal (Moffett-King *et al.*, 2002; Tayade *et al.*, 2005; Hanna *et al.*, 2006; Herington e Bany, 2007; Yang *et al.*, 2008; Picut *et al.*, 2009; Lash *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Estas células são um tipo de leucócito, com características morfológicas e bioquímicas específicas, que sintetizam uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2003). O recrutamento, a maturação e a diferenciação destas células são dependentes da síntese de interferon gama (IFN $\gamma$ ), interleucina 15 (IL15) e fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), dentre outras. Essas citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas por vários tipos celulares presentes na decídua, inclusive pelas próprias uNKs, e desempenham papel importante na resposta imune inata e adaptativa na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2000; Askar *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

O IFN $\gamma$  estimula a atividade fagocitária dos macrófagos e das células gigantes trofoblásticas contra microorganismos (Askar *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2014). A IL15 muda o fenótipo das células NK do interstício uterino e do sangue para o fenótipo das uNKs que estão presentes no endométrio durante a gestação (Kitaya *et al.*, 2003a, b; Keskin *et al.*, 2007; Acar *et al.*, 2011; Erlebacher, 2013). Além disso, a IL15 aumenta a atividade proliferativa e citolítica das uNKs *in vitro* (Ye *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2000). O MIF estimula a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), IFN $\gamma$ , IL2, IL6 e IL8 (Faria *et al.*, 2010; Cardaropoli *et al.*, 2012). Além disso, o MIF estimula a angiogênese e a proliferação celular, suprime a apoptose (Amin, 2003; Arcuri *et al.*, 2006; Viganò *et al.*, 2007) e reduz a capacidade citolítica das uNKs (Arcuri *et al.*, 2006), antagonizando, portanto, a IL15. Cartwright *et al.* (1999) demonstraram que a motilidade e a invasão das células trofoblásticas na decídua são altamente dependentes da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sintetizada pelos trofoblastos *in vitro*, uma citocina anti-inflamatória.

Ratas com hipo e hipertireoidismo apresentam redução da expressão de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  pelas células trofoblásticas dependendo do período gestacional (Silva *et al.*, 2014), enquanto mulheres com hipotireoidismo tem redução da expressão de IL4 e IL10, citocinas anti-inflamatórias, pelas células decíduais (Twig *et al.*, 2012). É importante ressaltar que alteração na população e na atividade citolítica das uNKs no endométrio de mulheres gestantes está associada à complicações gestacionais, como aborto e restrição do crescimento intra-uterino (Askar *et al.*, 2003) e é modulada pela IL15 (Ye *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2000). Além disso, camundongos que não possuem células uNKs são férteis, mas exibem remodelamento vascular uterino inadequado, pobre decidualização e baixo peso fetal (Colucci *et al.*, 2011). Pesquisas já demonstraram que o hipertireoidismo materno favorece o ambiente anti-inflamatório placentário

em ratas por aumentar a expressão de IL10 e iNOS e reduzir a expressão de TNF $\alpha$  no meio da gestação (Silva *et al.*, 2014). O hipotireoidismo, pelo contrário, compromete esse ambiente anti-inflamatório por reduzir a expressão de IL10 e iNOS (Silva *et al.*, 2014). Contudo, ainda não há nenhuma evidência se na decídua de animais com disfunção tireoidiana ocorre o mesmo efeito. O que se sabe é que a síntese *in vitro* de citocinas inflamatórias pelas células deciduais humanas é responsiva à triiodotironina (T<sub>3</sub>) (Vasilopoulou *et al.*, 2014).

Apesar de terem pesquisas que investigaram os efeitos das disfunções tireoidianas na placenta de ratas (Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014), a população de células uNKs e a expressão de fatores imunológicos na decídua de animais com hipo e hipertireoidismo carece de pesquisas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do hipotireoidismo e do excesso de tiroxina (T<sub>4</sub>) na detecção imunistoquímica das citocinas IFN $\gamma$ , IL15, iNOS, MIF e da Lectina DBA para avaliação das células uNK e da expressão de transcritos gênicos para *Ifn $\gamma$*  e *iNos* na decídua e glândula metrial ao longo da gestação em ratas.

#### **4. Materiais e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo no. 239/2011).

##### **4.1. Manejo dos animais e indução das disfunções tireoidianas**

Foram utilizadas 108 ratas Wistar com dois meses de idade alojadas em caixas plásticas (6 animais/caixa) onde receberam 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 três grupos, hipotireoideo, tratadas com L-tiroxina (T<sub>4</sub>) e controle, sendo cada grupo com 36 animais. Os grupos hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> receberam diariamente, por sonda orogástrica, durante 5 dias, 1 mg/animal de 6-propyl-2-thiouracil (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013) e 50  $\mu$ g/animal de L-tiroxina (Serakides *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013), respectivamente, diluídos em 5 mL de água destilada. Os animais do grupo controle receberam água destilada como placebo.

Após cinco dias do início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal (Marcondes *et al.*, 2002) para acompanhamento do ciclo estral. Neste mesmo período, seis ratas de cada grupo foram eutanasiadas com sobredose de anestésico para colheita de sangue e dosagem de T<sub>4</sub> livre para confirmação da indução das disfunções tireoidianas.

As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas. Após esse período, esfregaços vaginais foram realizados diariamente pelo início da manhã, a fim de detectar a presença de espermatozoides, o que confirmava a cópula, e esse dia era designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais do grupo hipotireoideo, tratado com T<sub>4</sub> e controle continuaram com o tratamento, como descrito acima, até os dias da eutanásia.

#### **4.2. Coleta de sangue e eutanásia**

Nos dias 7, 10, 12, 14 e 19 de gestação, seis animais de cada grupo foram eutanasiados com sobredose de anestésico. Após serem anestesiados com xilazina<sup>1</sup> (5 mg/Kg, intramuscular) e quetamina<sup>2</sup> (50 mg/Kg intramuscular), eles foram submetidos à colheita de sangue por punção intracardiaca. O sangue foi colhido em tubos com heparina para obtenção do plasma e este armazenado a -20°C para posterior dosagem de triiodotironina (T<sub>3</sub>) e tiroxina (T<sub>4</sub>) livre. A dosagem 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.

#### **4.3. Necropsia e colheita de material**

Após a eutanásia, aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG, o útero contendo a placenta e os fetos foram separados da tuba e dos ovários. Foram retirados aleatoriamente cinco sítios de inserção placentária por rata. Os sítios foram dissecados e a decídua juntamente com as membranas fetais foram coletadas. A decídua de dois sítios de inserção placentária por rata foi fixada em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Em seguida foi processada pela técnica rotineira de inclusão em parafina e submetida a microtomia para obtenção de secções de 4µm para corar pela hematoxilina-eosina e para imunoistoquímica para avaliação da expressão de IFN $\gamma$ , iNOS, MIF, IL15 e Lectina DBA. Para a realização do RT-PCR tempo real para os genes *Ifn $\gamma$*  e *iNos*, foram coletados somente a região de decídua juntamente com a glândula metrial de dois sítios da interface materno-fetal por animal, nos períodos de 10, 12, 14 e 19 DG. As amostras foram mergulhadas imediatamente em Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até a análise.

#### **4.4. Imunoistoquímica**

Foram utilizados anticorpos anti-IFN $\gamma$  (1:200) (AB9657, Abcam, Cambridge, UK), anti-iNOS (1:100) (AB15323, Abcam, Cambridge, UK), anti-MIF (1:500) (AB7207, Abcam, Cambridge, UK), anti-IL15 (1:300) (AF447, RD System, Minneapolis, USA) e anti-lectina DBA (1:300) (L6533-5MG, Sigma, Saint Louis, USA). A técnica desenvolvida foi a da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Dako LSAB+ System-HRP, Carpinteira, CA, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando tampão Citrato (2,1g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada, ajustando o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Dako Protein Block Serum-Free Ready-To-Use, Carpinteira, CA, USA) e estreptavidina peroxidase. Os anticorpos primários anti-IFN $\gamma$ , o anti-iNOS, anti-MIF, anti-IL15 e anti-Lectina DBA foram incubados *overnight*. A incubação com anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno foi a diaminobenzidina (Dako DAB Substrate Chromogen System, Carpinteira, CA, USA). As secções foram contra-coradas com

---

<sup>1</sup> Kensol- Cloridrato de xilazina a 2% (*Laboratórios König, Avellaneda- Argentina*)

<sup>2</sup> Quetamina Injetável Vetnil- 10mg/mL- (*Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários LTDA- Louveira- SP, Brasil*)

hematoxilina. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por soro bloqueio.

Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$ , MIF, iNOS, IL15 e Lectina DBA nas camadas de decídua mesometrial e antimesometrial, aos 7 DG, decídua mesometrial, aos 10 DG, e decídua basal e glândula metrial, aos 12, 14 e 19 DG, adjacente ao sítio de inserção placentária. A avaliação quantitativa foi realizada em três sítios de inserção placentária/rata. Uma secção histológica/sítio de inserção placentária foi feita transversalmente sempre no mesmo ponto, incluindo a decídua e a glândula metrial com seus vasos sanguíneos e o disco placentário, para padronização do local de análise. Para determinar a intensidade e a área de imunomarcção, imagens foram fotografadas com a câmera digital Spot Color Insight (SPOTTM, Sterling Heights, Michigan, USA) acoplada a um microscópio Olympus BX-40. A densidade integrada e a área de imunomarcção foram determinadas pelo WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foi feito. Os dados de cada decídua foram arquivados, analisados e expressos como densidade integrada e área de imunomarcção em pixels.

#### 4.5. RT-PCR Tempo Real

O mRNA total da região de decídua e glândula metrial foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 1 $\mu$ g de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As reações foram realizadas em um termociclador *Smart Cycler II* (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, EUA).

Realizou-se PCR em tempo real com *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) no *AB The Applied Biosystems™ ViiA™ 7 system* (*Applied Biosystems, Life Technologies*). Para os controles negativos, utilizou-se o Mix de amplificação de DNA completo e a amostra contendo o cDNA alvo foi substituído por água. As amplificações foram realizadas utilizando as condições de ciclagem padrão: ativação da enzima a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s e pareamento dos primers/extensão a 60°C durante 60 seg. Para avaliar a linearidade e eficiência da amplificação por PCR, foram geradas curvas padrão para todos os transcritos utilizando diluições em série de cDNA. A curva de fusão foi obtida para os produtos de amplificação para determinar as suas temperaturas de fusão. A expressão gênica foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde os valores das amostras foram calculados e calibrados em relação aos valores do CT de  $\beta$ -actina. Os primers estão listados na Tabela 1. Todas as análises foram realizadas nas regiões de decídua mais glândula metrial aos 10, 12, 14 e 19 DG.

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

| Genes           | Primers  | Número de acesso |
|-----------------|--|------------------|
| <i>Ifny</i>     | Forward 5'- AGTGCTACACGCCGCGTCTT -3'<br>Reverse 5'- AGTGTGCCTTGGCAGTAACAGCC -3'  | NM_138880.2      |
| <i>iNos</i>     | forward 5'- TGGTCCTGCAGGCTCACGGT -3',<br>reverse 5'- ACTCGAGGCCACCCACCTCC -3'    | NM_012611.3      |
| $\beta$ -actina | Forward 5'- TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'<br>Reverse 5'- CGACGAGCGCAGCGATATCGT -3' | NM_031144.2      |

#### 4.6. Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com fatorial 3X5 (3 grupos, 5 períodos) para as análises de imunoistoquímica e fatorial 3X4 para o RT-PCR tempo real. A ANOVA foi realizada e, para cada variável, foi determinada a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste SNK. As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR em tempo real foram comparadas pelo teste SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ .

### 5. Resultados

#### 5.1. Indução das disfunções tireoidianas

A indução do hipotireoidismo e o excesso de  $T_4$  durante todo o período gestacional foram confirmados pela concentração plasmática de  $T_3$  e  $T_4$  livre nos dias 0 e 19 de gestação e pela sintomatologia apresentada pelos animais. As ratas tratadas com PTU apresentaram concentrações menores de  $T_3$  (Tab. 2) e  $T_4$  (Tab. 3) livres em relação às do grupo controle (Tab. 2 e 3) e sinais clínicos de letargia e alopecia. As ratas tratadas com tiroxina exibiram concentrações maiores somente de  $T_4$  (Tab. 3) livre quando comparadas às dos animais do grupo controle (Tab. 3) e apresentaram sinais clínicos caracterizados por agressividade e exoftalmia.

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de  $T_3$  livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

|                | Controle       | Hipotireoideo  | Tratado com $T_4$ |
|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| <b>Dia 0</b>   | 2,345 ±0,289 a | 1,856 ±0,188 b | 2,627 ±0,284 a    |
| <b>19 Dias</b> | 1,757 ±0,281 a | 1,180 ±0,155 b | 1,977 ±0,553 a    |

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

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de  $T_4$  livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

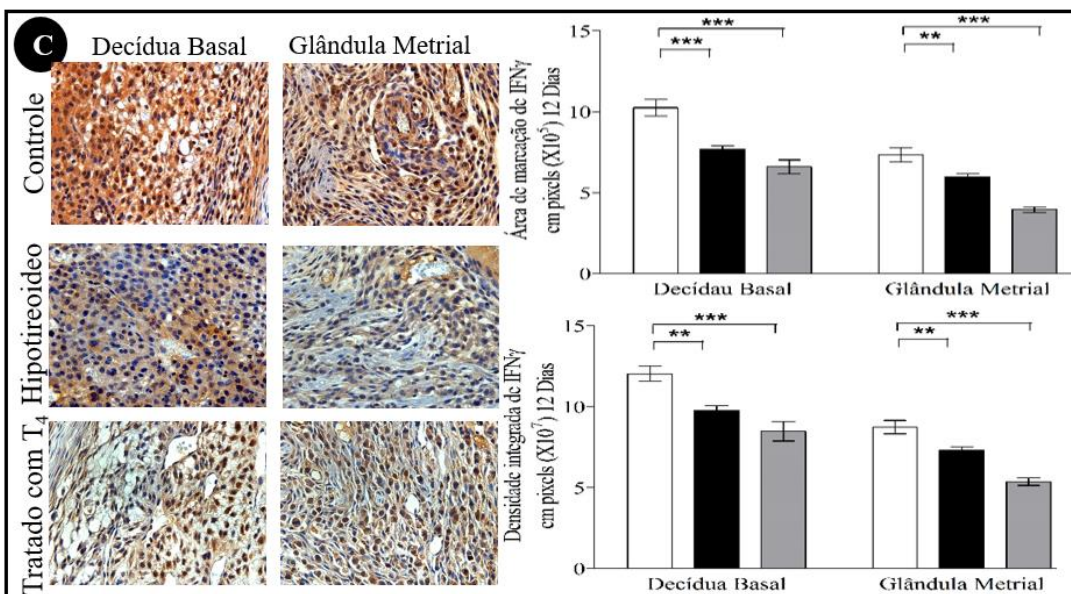
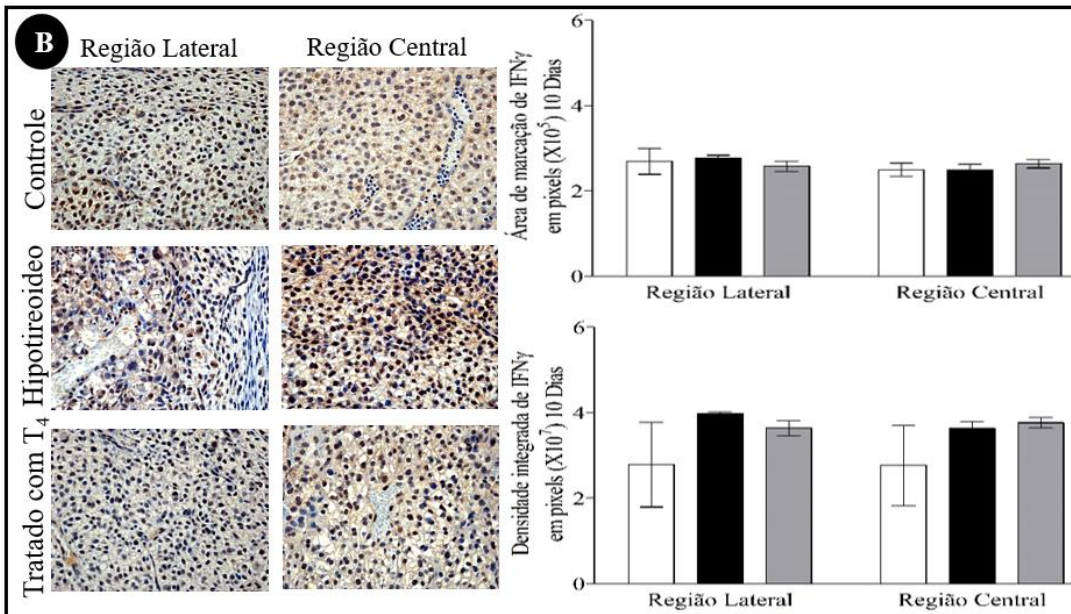
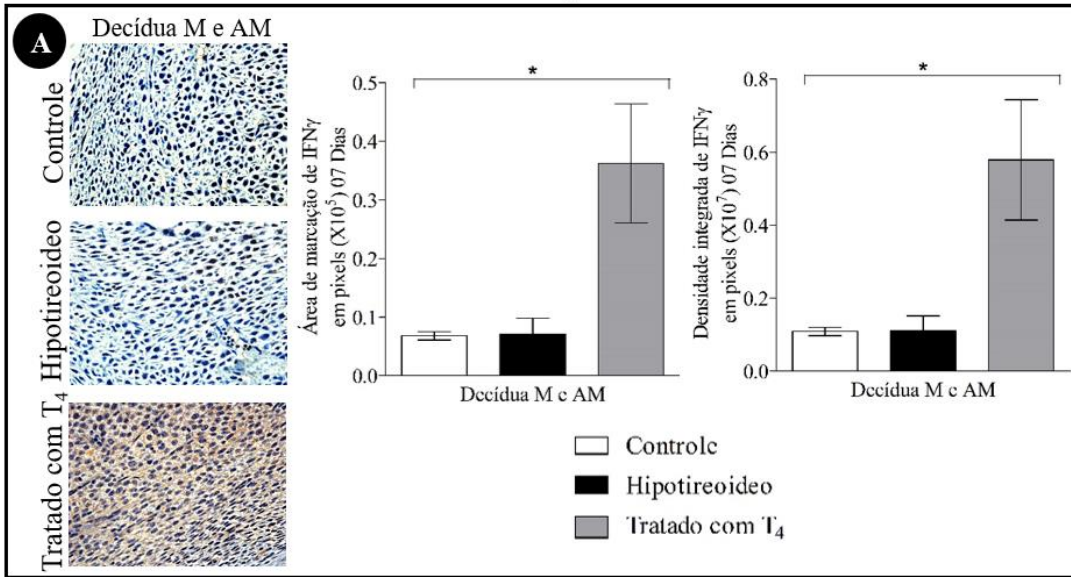
|                | Controle       | Hipotireoideo  | Tratado com $T_4$ |
|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| <b>Dia 0</b>   | 1,196 ±0,123 a | 0,437 ±0,095 b | 4,732 ±0,891 c    |
| <b>19 Dias</b> | 0,795 ±0,173 a | 0,104 ±0,080 b | 2,460 ±0,643 c    |

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

#### 5.2. Imunoistoquímica

Independentemente do grupo experimental, as regiões de decídua mostraram detecção de IFN $\gamma$  (Fig. 1 e 6; Tab. 4 e 5), iNOS (Fig. 3 e 6; Tab. 4 e 5), IL15 (Fig. 2; Tab. 4), MIF (Fig. 4; Tab. 4) e Lectina DBA (Fig. 5; Tab. 4) nas camadas de decídua mesometrial e antimesometrial, aos 7 DG, decídua mesometrial, aos 10 DG, e decídua basal e glândula metrial, aos 12, 14 e 19 DG. Os resultados tanto da área de imunomarcção quanto da intensidade de imunomarcção foram, na maioria das variáveis estudadas, muito semelhantes, com algumas exceções. A detecção imunois-

# IFN $\gamma$



## IFN $\gamma$

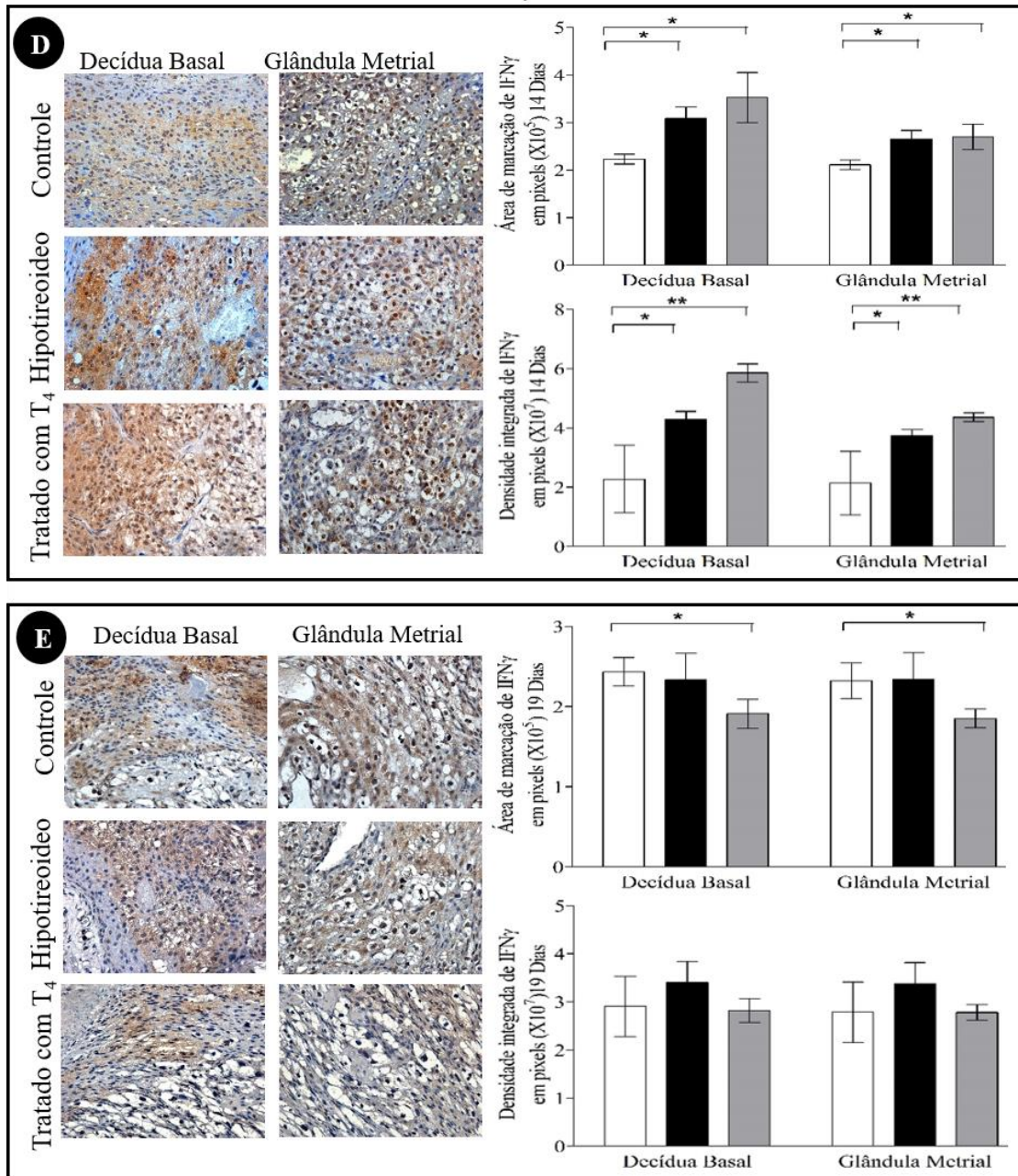
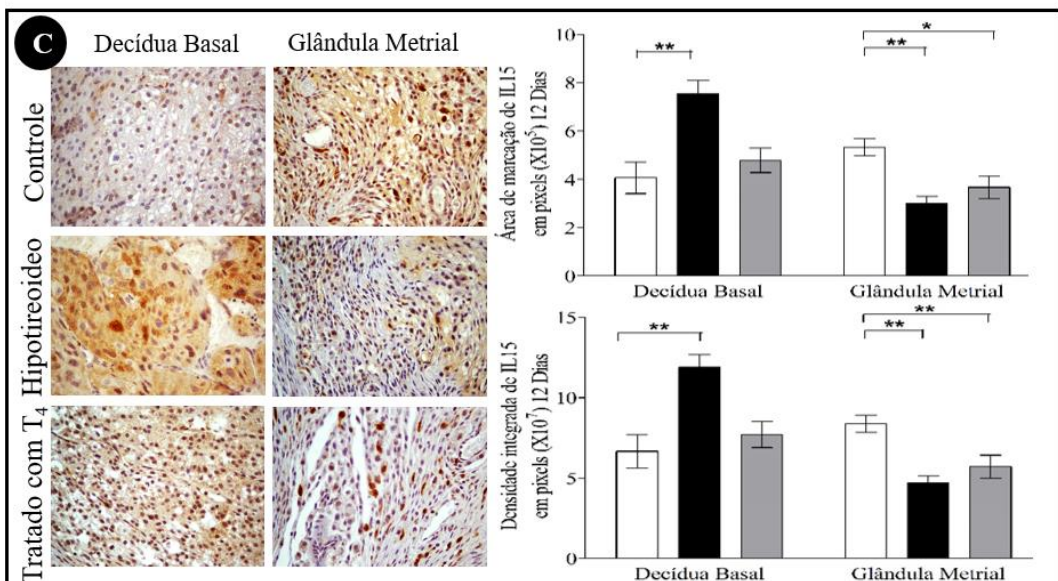
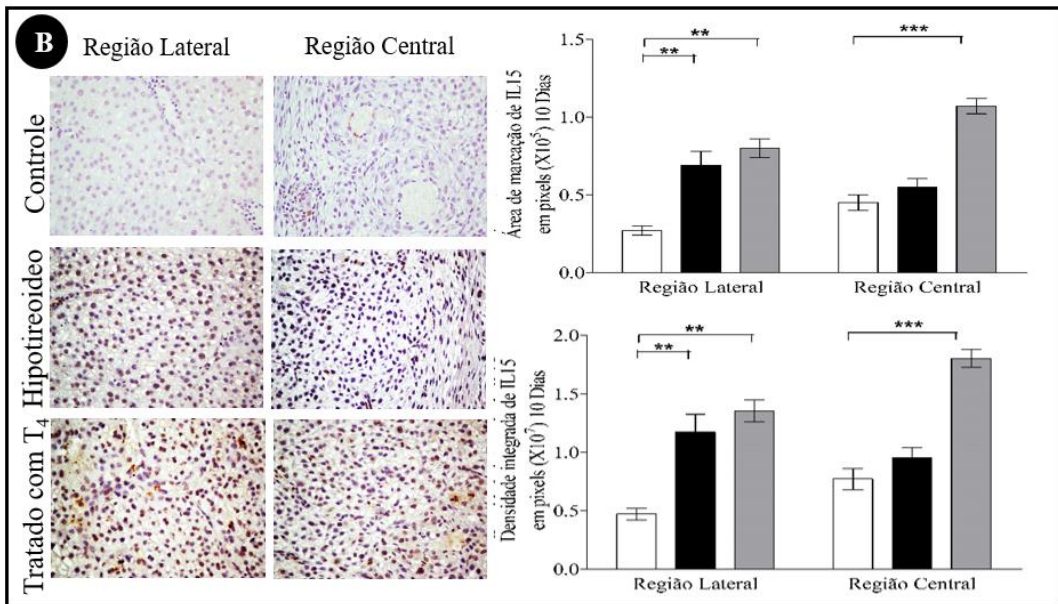
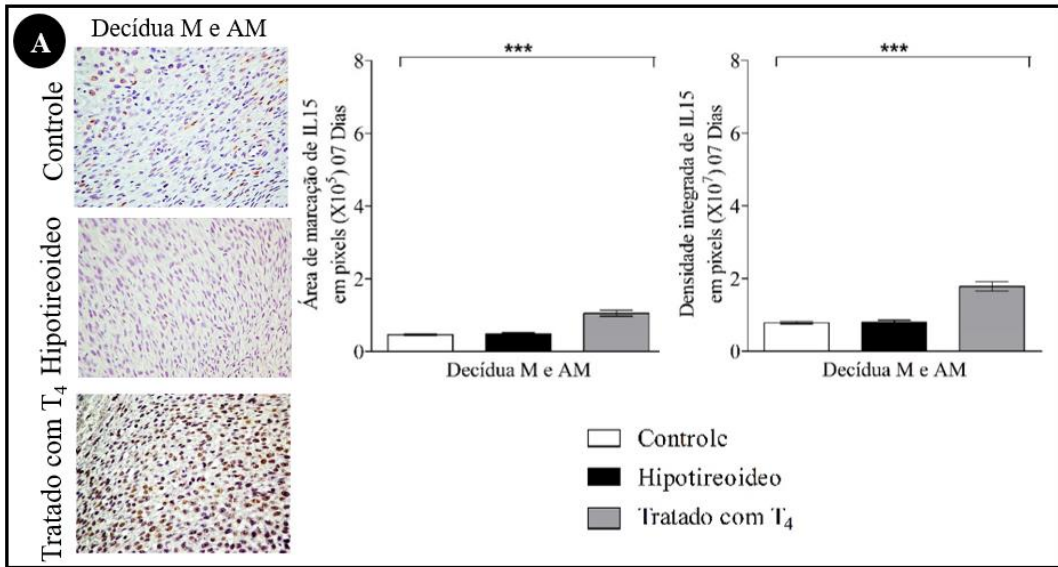


Figura 1. Detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$  na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de IFN $\gamma$  na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua aos 10 DG sem diferença significativa entre os grupos tratado e controle. (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (E) Detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$  na decídua basal e glândula metrial aos 19 DG com redução da área de imunomarcção no grupo tratado com T<sub>4</sub> em relação ao controle. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

## IL15





## IL15

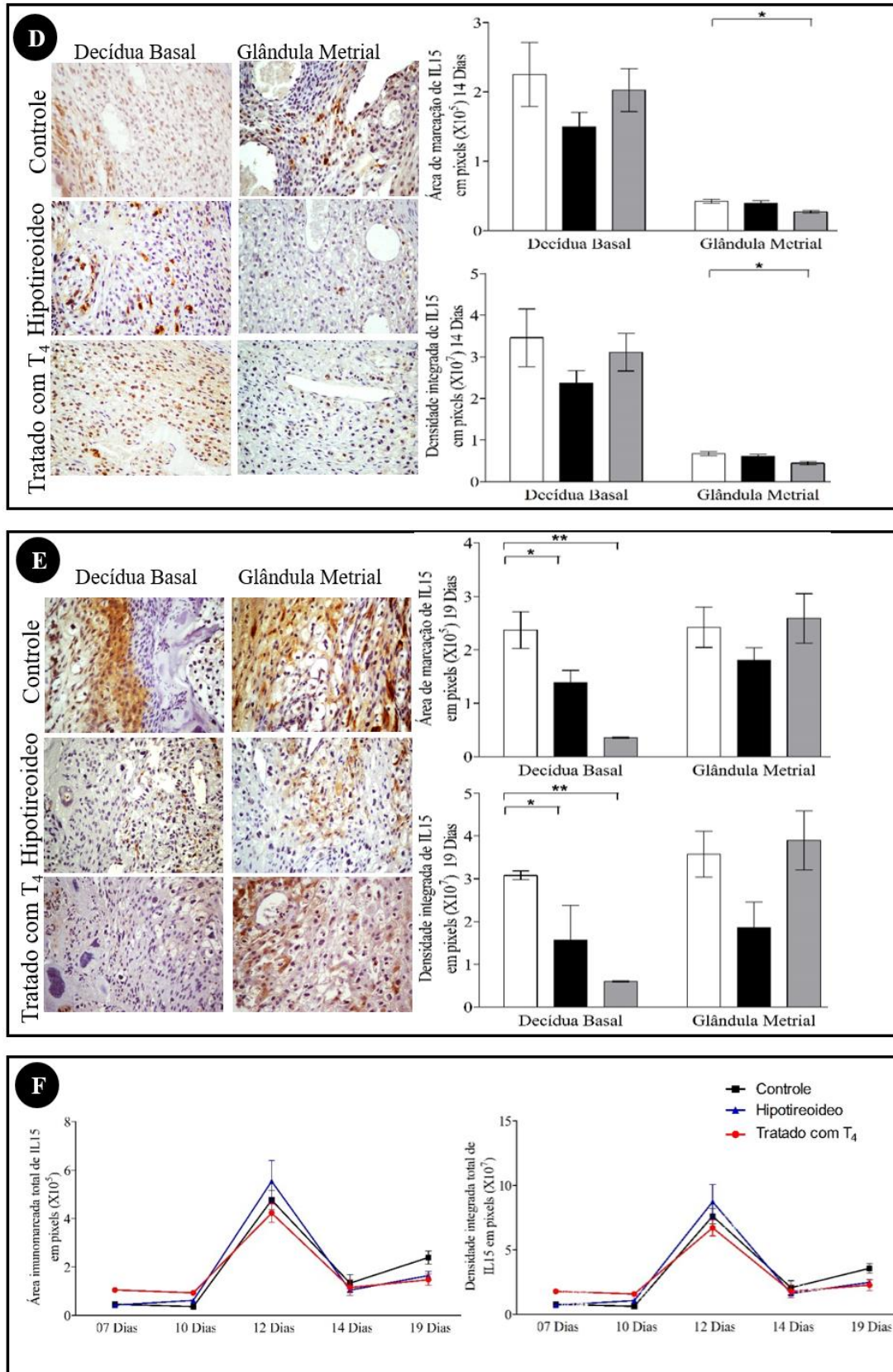


Figura 2. Detecção imunohistoquímica de IL15 na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de IL15 na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção do grupo tratado com T<sub>4</sub> na região

lateral e central e do grupo hipotireoideo na região lateral. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na glândula metrial em ambos os tratamentos e aumento na decídua basal no grupo hipotireoideo, em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de glândula metrial. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção na região de decídua basal nos grupos hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> em relação ao controle. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de IL15 na decídua de ratas aos 07, 10, 12, 14 e 19 DG, são observadas que entre os dias 7 e 10 e 14 e 19 de gestação não houve diferenças significativas entre os períodos em cada grupo. Aos 12 DG houve um pico da imunomarcção para IL15 em relação aos demais períodos analisados. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

-toquímica de IFN $\gamma$ , IL15 e MIF foi nuclear e/ou citoplasmática, ao contrário da expressão do iNOS e Lectina DBA que foi apenas citoplasmática. A detecção máxima de IFN $\gamma$  (Fig. 6A), IL15 (Fig. 2F) e iNOS (Fig. 3F) ocorreu aos 12 DG, em comparação aos demais períodos de gestação. Já o MIF e a Lectina DBA não tiveram um padrão de expressão bem definidos entre os períodos e não apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos avaliados (Fig. 4F e 5F; Tab. 4).

Aos sete DG, o grupo tratado com T<sub>4</sub> apresentou maior área e maior densidade de imunomarcção para o IFN $\gamma$  em relação ao controle (Fig. 1A;  $P < 0,05$ ). Aos 12 DG houve redução da imunomarcção tanto no grupo hipotireoideo ( $P < 0,01$ ) quanto no tratado com T<sub>4</sub> ( $P < 0,001$ ) (Fig. 1C) em relação ao controle. Ao contrário, aos 14 DG, houve aumento de IFN $\gamma$  em relação ao controle tanto na intensidade quanto na área de imunomarcção na decídua basal e glândula metrial. Aos 19 dias, houve redução da área de imunomarcção de IFN $\gamma$  somente no grupo tratado com T<sub>4</sub>, tanto na decídua basal quanto na glândula metrial (Fig. 1D;  $P < 0,05$ ), sem, contudo, interferir com a densidade integrada.

A área e a densidade de imunomarcção para IL15 aumentaram aos sete DG no grupo tratado com T<sub>4</sub> (Fig. 2A;  $P < 0,001$ ). Aos 10 dias, houve aumento da densidade e da área de imunomarcção para IL15 na região lateral tanto no grupo hipotireoideo quanto no tratado com T<sub>4</sub> (Fig. 2B;  $P < 0,01$ ). Entretanto, na região central foi somente no grupo tratado com T<sub>4</sub> que houve esse aumento (Fig. 2B;  $P < 0,001$ ). Aos 12 dias, o aumento da área e da densidade de imunomarcção se manteve somente no grupo hipotireoideo na região da decídua basal (Fig. 2C;  $P < 0,01$ ). Contudo na região da glândula metrial houve redução tanto no grupo hipotireoideo ( $P < 0,01$ ) quanto no tratado com T<sub>4</sub> ( $P < 0,01$ ) (Fig. 2C). Apesar dessa redução foi observado o pico de expressão de IL15 aos 12 DG tendo sido estatisticamente diferente dos demais períodos analisados (Fig. 2F). Aos 14 DG observou-se a redução da área e da intensidade de imunomarcção para IL15, no grupo tratado com T<sub>4</sub> na região de glândula metrial (Fig. 2D;  $P < 0,05$ ). Aos 19 DG, entretanto, essa redução se deu na região de decídua basal tanto para o grupo hipotireoideo ( $P < 0,05$ ) quanto para o tratado com T<sub>4</sub> ( $P < 0,01$ ) (Fig. 2E).

Com relação à imunomarcção para a oxido nítrico sintase induzível (iNOS), aos sete DG, observou-se aumento da área e da densidade de imunomarcção na região de decídua do grupo hipotireoideo (Fig. 3A;  $P < 0,05$ ). Aos 10 DG, entretanto, houve aumento somente no grupo tratado com T<sub>4</sub> (Fig. 3B;  $P < 0,05$ ) na região central, nas células mais próximas ao trofoblasto fetal, em comparação ao controle. Já aos 12 DG na decídua basal houve redução tanto no grupo hipotireoideo quanto no tratado com T<sub>4</sub> para a área e densidade integrada de imunomarcção, em relação ao controle (Fig. 3C;  $P < 0,05$ ). Entretanto, na região de glândula metrial essa redução foi observada somente no grupo hipotireoideo (Fig. 3C;  $P < 0,05$ ). Apesar dessa redução foi observado o pico de expressão de iNOS aos 12 DG tendo sido estatisticamente diferente dos demais períodos analisados (Fig. 3F) como ocorreu na IL15 e IFN $\gamma$ . Aos 14 DG a redução no

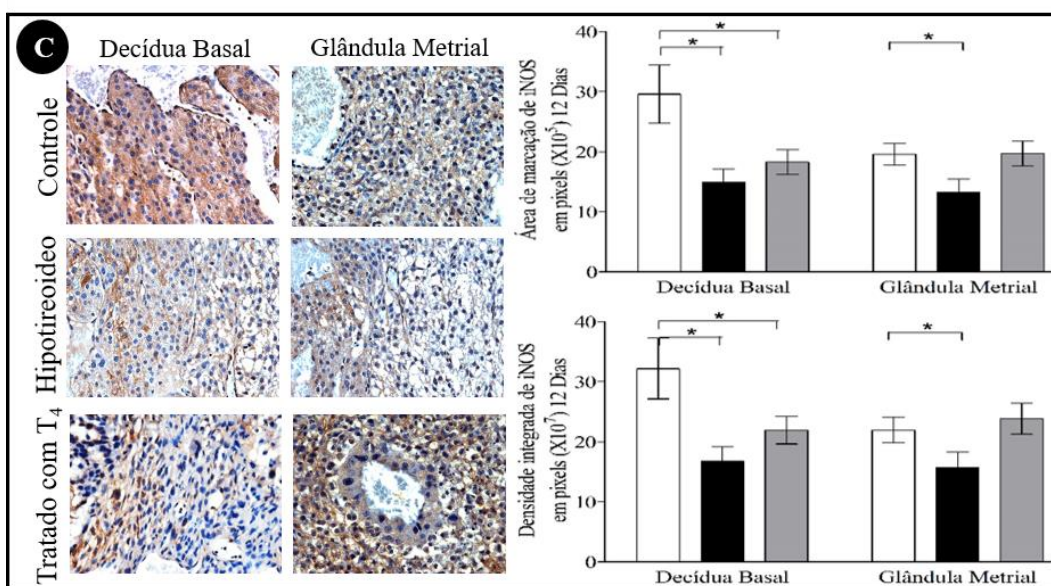
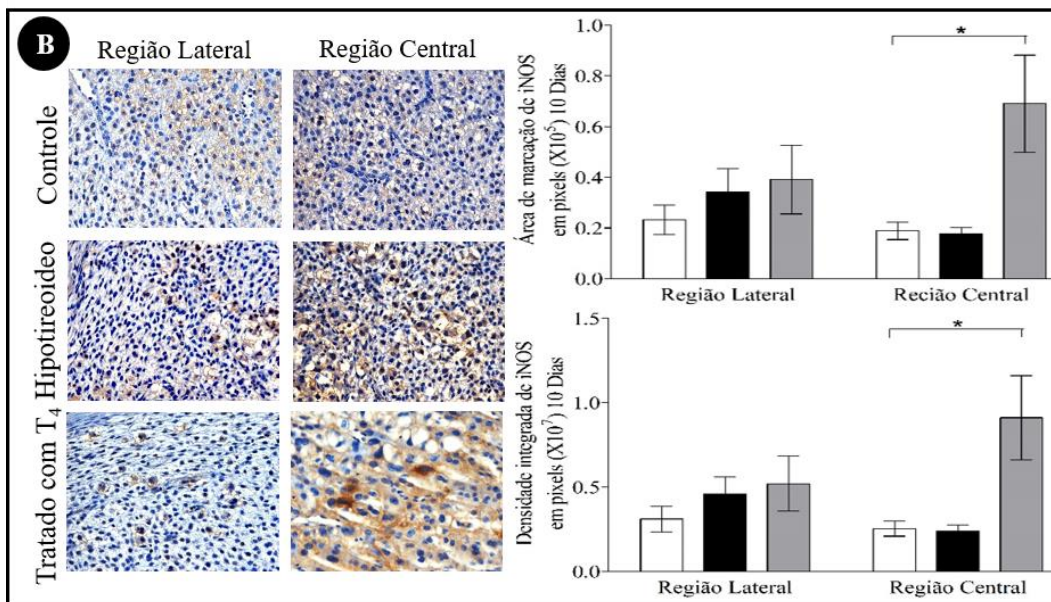
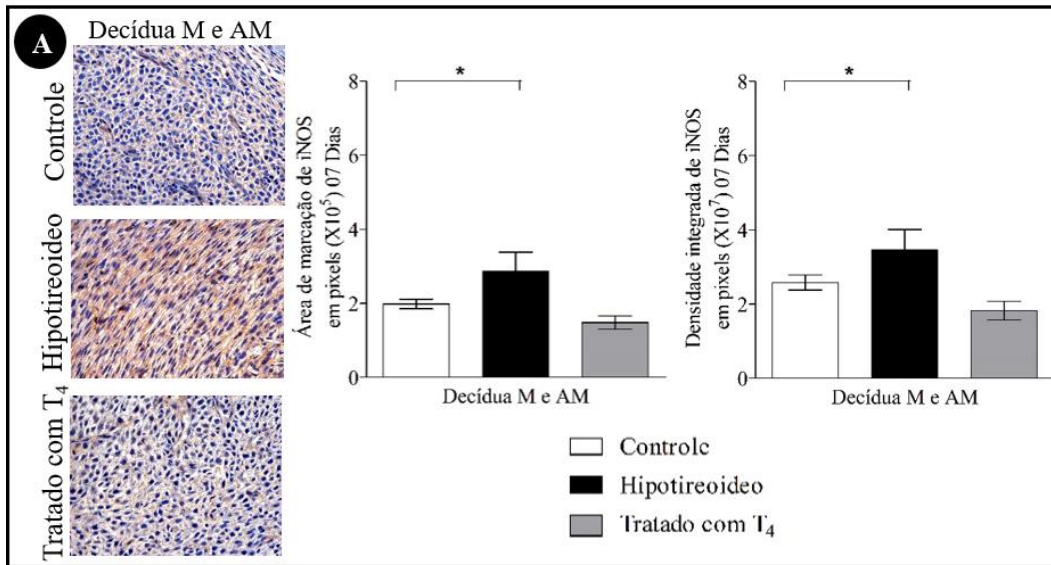
grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle manteve-se proporcional na região de glândula metrial (Fig. 3D;  $P < 0,05$ ), semelhante aos 12 DG. Dos 14 para os 19 DG, a proporção manteve-se semelhante com o mesmo padrão na região de glândula metrial de imunomarcção, com redução do grupo hipotireoideo (Fig. 3E;  $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

A área e a intensidade de imunomarcção para o MIF reduziu intensamente no grupo hipotireoideo aos sete DG em relação ao grupo controle ( $P < 0,001$ ). Ao contrário, o grupo tratado com  $T_4$  apresentou aumento ( $P < 0,05$ ) da expressão proteica de MIF em relação ao controle (Fig. 4A). Aos 10 DG, ambos os grupos tratados apresentaram aumento na imunomarcção para MIF, sendo a área e a densidade mais intensa no grupo hipotireoideo do que no tratado com  $T_4$  (Fig. 4B). Aos 12 DG, na decídua basal houve aumento da expressão proteica de MIF no grupo hipotireoideo ( $P < 0,01$ ) e redução no grupo tratado com  $T_4$  ( $P < 0,05$ ), em relação ao controle. Contudo, na glândula metrial houve diferença no padrão de expressão. No grupo tratado com  $T_4$  houve aumento da imunomarcção ( $P < 0,05$ ) enquanto que o grupo hipotireoideo não teve diferença significativa em relação ao controle (Fig. 4C). Aos 14 dias, na decídua basal, observou-se aumento de MIF em ambos os grupos tratados ( $P < 0,05$ ), em relação ao controle. Entretanto na região da glândula metrial o aumento foi observado somente no grupo hipotireoideo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 4D). Aos 19 DG não foram observadas diferenças significativas entre grupos (Fig. 4E).

Ainda com relação à expressão de MIF observou-se que a flutuação da expressão de MIF ao longo da gestação não seguiu um padrão, com um pico de expressão, como nas marcações pelos  $IFN\gamma$ , IL15 e iNOS (Fig. 4F). Aos 10 DG observou-se que a redução da área e da intensidade de imunomarcção se manteve nos grupos tratados em relação ao controle, na região central. Já na glândula metrial, essa redução foi somente observada na área de marcação e não na intensidade. Aos 12 DG, contudo na glândula metrial houve aumento da imunomarcção para MIF no grupo tratado com  $T_4$ . Aos 14 dias houve redução da expressão proteica de MIF no grupo hipotireoideo em relação ao controle somente na região de decídua basal, tanto na área quanto na intensidade de imunomarcção. Aos 19 dias não houve diferença significativa entre grupos.

A imunomarcção para lectina DBA aos 07 DG reduziu em ambos os grupos tratados em relação ao controle, entretanto a redução foi mais intensa no grupo hipotireoideo ( $P < 0,001$ ) do que no tratado com  $T_4$  ( $P < 0,05$ ) (Fig. 5A). Ambos os tratamentos reduziram a imunomarcção para as células uNK DBA<sup>+</sup> na região central da decídua mesometrial (Fig. 5B). Aos 10 DG, na região lateral, houve redução da imunomarcção para as células uNK DBA<sup>+</sup>, sendo sua presença mais evidente na região central onde há a presença da arteríola espiralada central. Nesta região, as células uNK apresentavam-se ora volumosas, ora semelhantes a linfócitos com escasso citoplasma. Neste período da gestação as células decíduais também expressaram lectina DBA. A expressão de lectina DBA nas células uNK foi diferenciada, forte e junto à membrana nuclear. Neste período, foi possível visualizar as células uNK infiltrando na glândula metrial e dispondo-se concêntricamente ao redor dos vasos sanguíneos. Este padrão concêntrico torna-se mais evidente aos 12 e 14 DG. Aos 12 DG observou-se maior intensidade de imunomarcção para lectina DBA no grupo tratado com  $T_4$ , tanto na decídua basal ( $P < 0,05$ ) quanto na glândula metrial ( $P < 0,001$ ) (Fig. 5C) o que pode indicar a presença e maior diferenciação das células uNK DBA<sup>+</sup>. Já aos 14 DG observou-se redução da densidade ( $P < 0,001$ ) e da área ( $P < 0,01$ ) de imunomarcção para lectina DBA no grupo hipotireoideo, somente na região de decídua basal (Fig. 5D). Aos 19 DG a marcação torna-se mais fraca e as células têm aspecto mais vacuolizado, caracterizando o processo degenerativo que ocorre comumente ao final da gestação e não houve diferença de imunomarcção entre os grupos tratados (Fig. 5E).

## iNOS



## iNOS

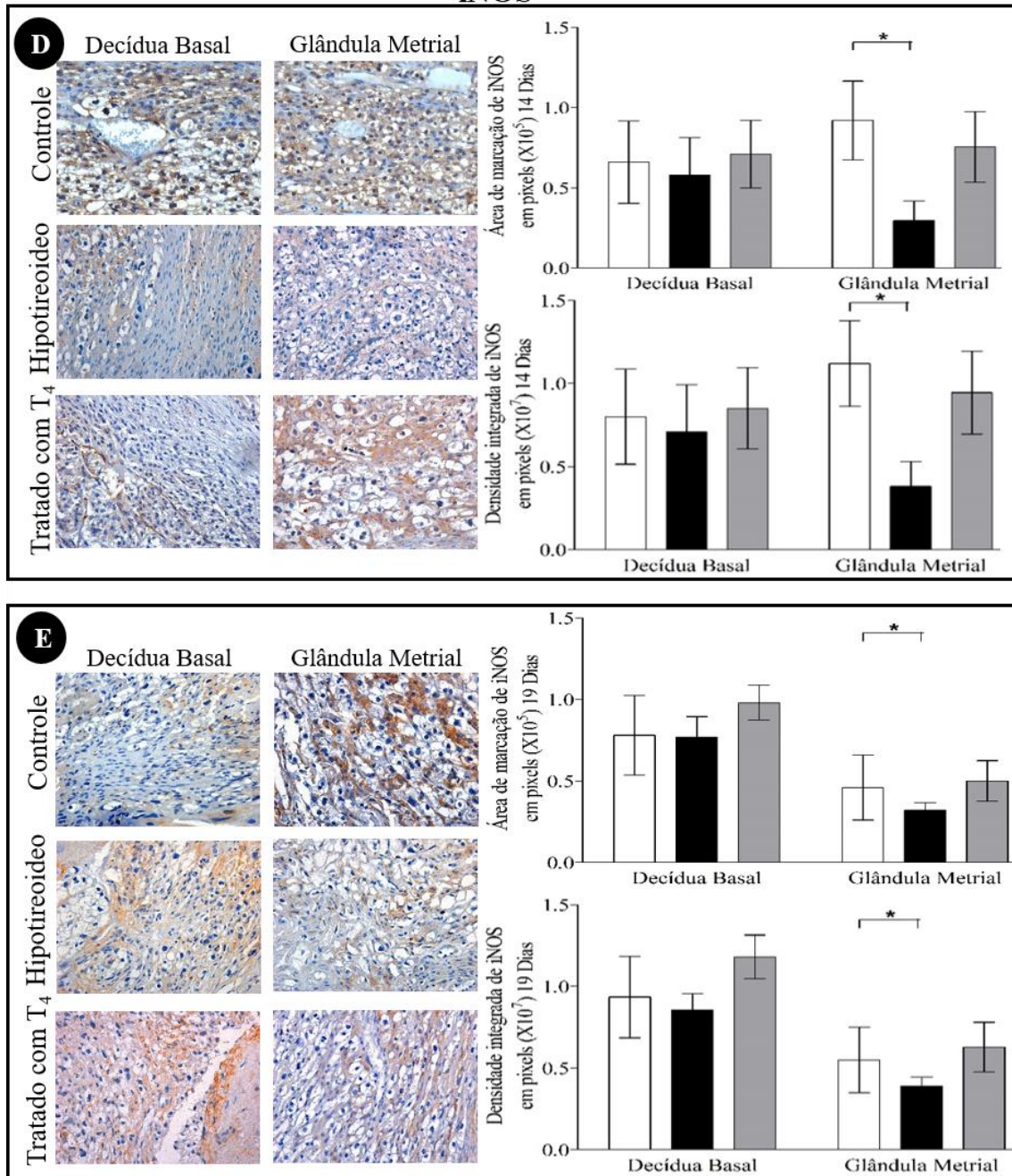
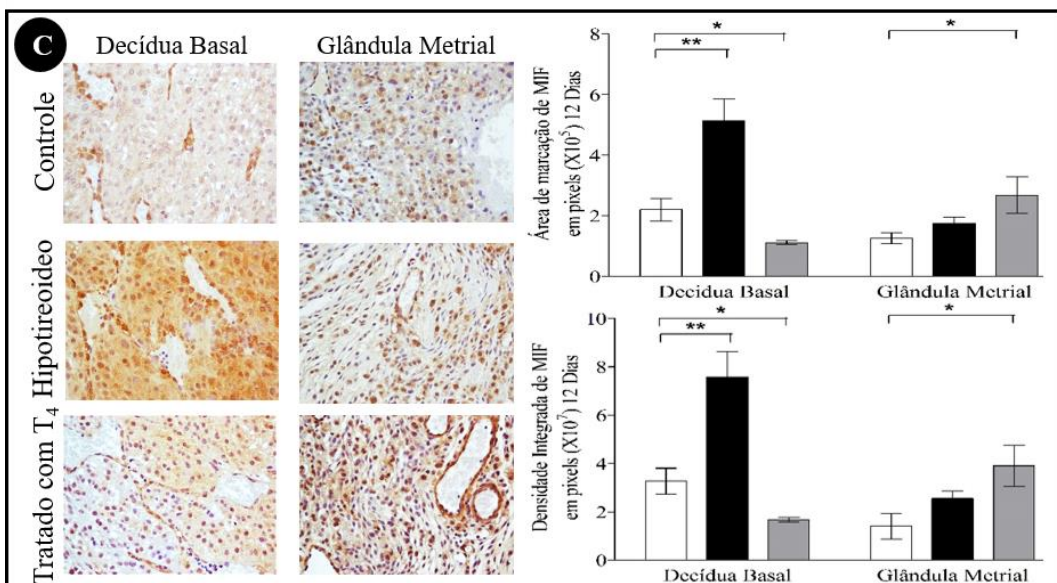
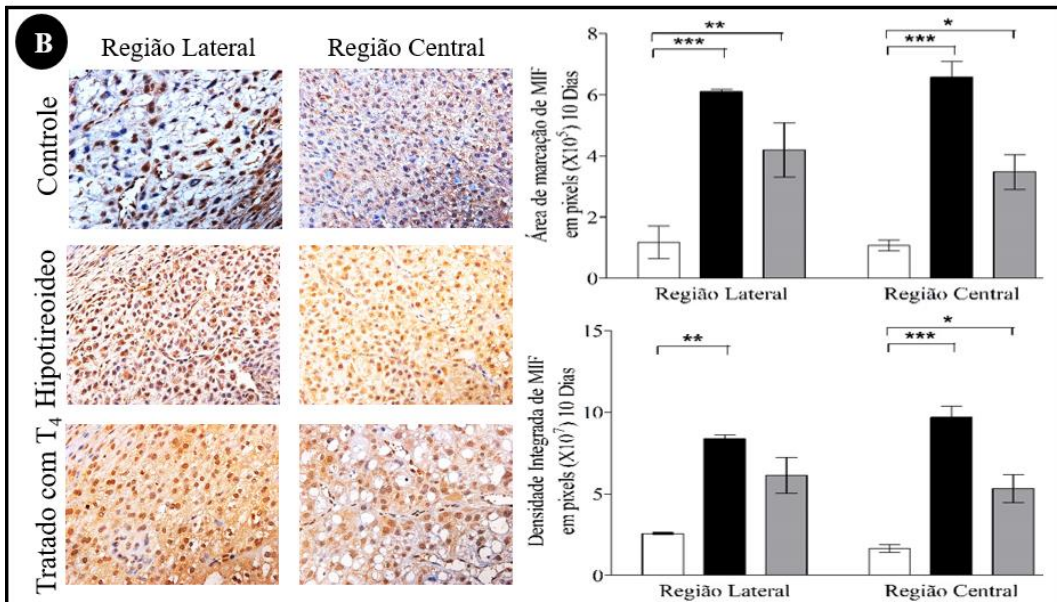
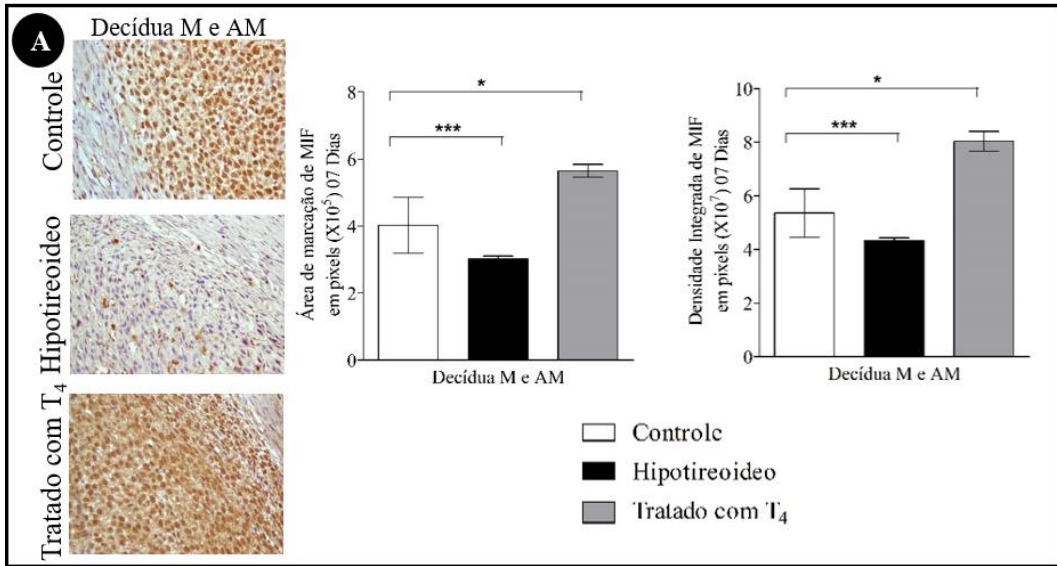


Figura 3. Detecção imunistoquímica de iNOS na decídua e glândula metrial de ratos dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Decídua aos 07 DG com aumento da área e intensidade de imunomarcção de iNOS na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoideo em comparação com o grupo de controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção na região central do grupo tratado com T<sub>4</sub>. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redução tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal em ambos os tratamentos e na glândula metrial no grupo hipotireoideo, em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de glândula metrial do grupo hipotireoideo. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção na região de glândula metrial no grupo hipotireoideo em relação ao controle. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ )

## MIF



## MIF

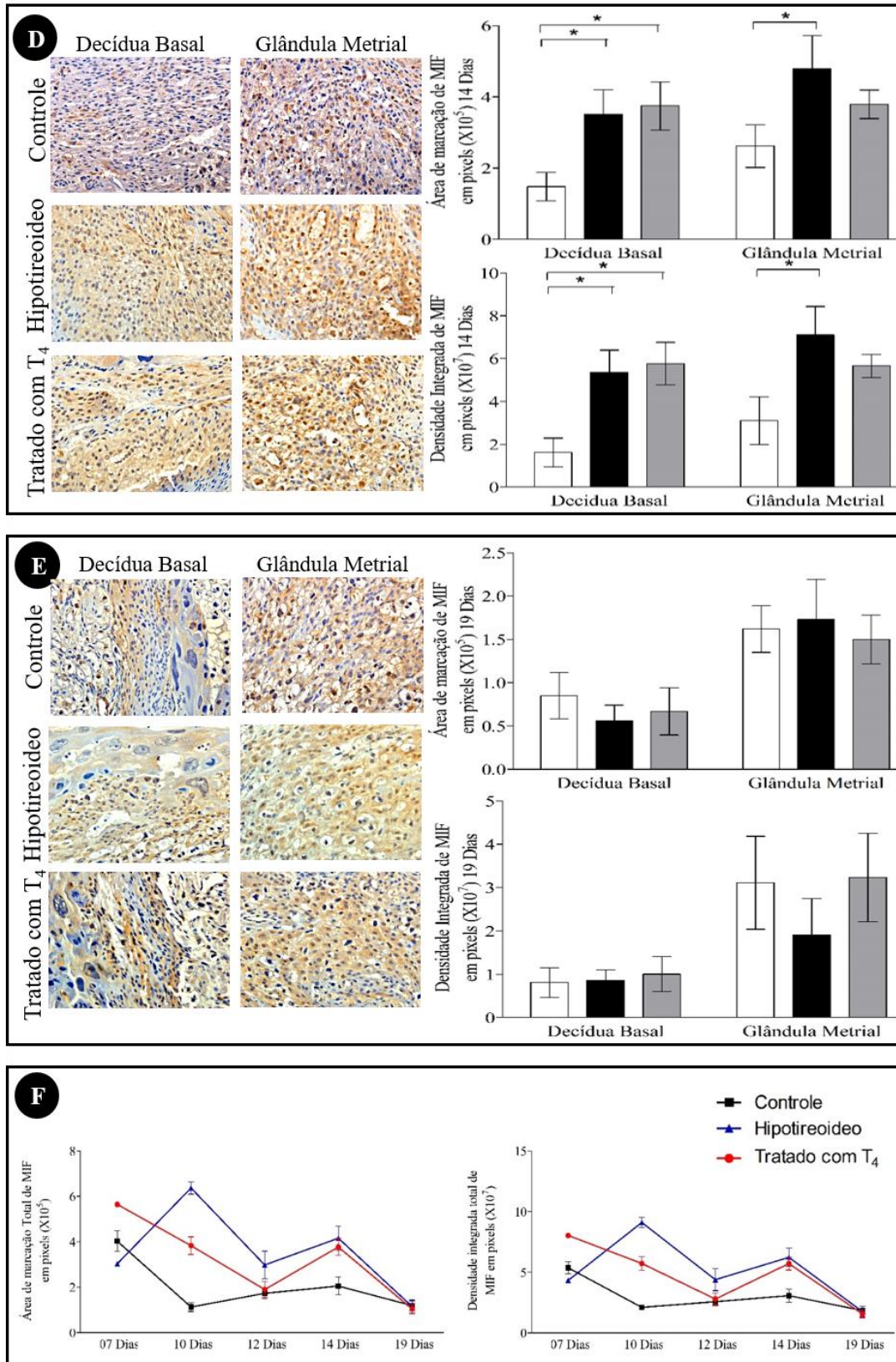
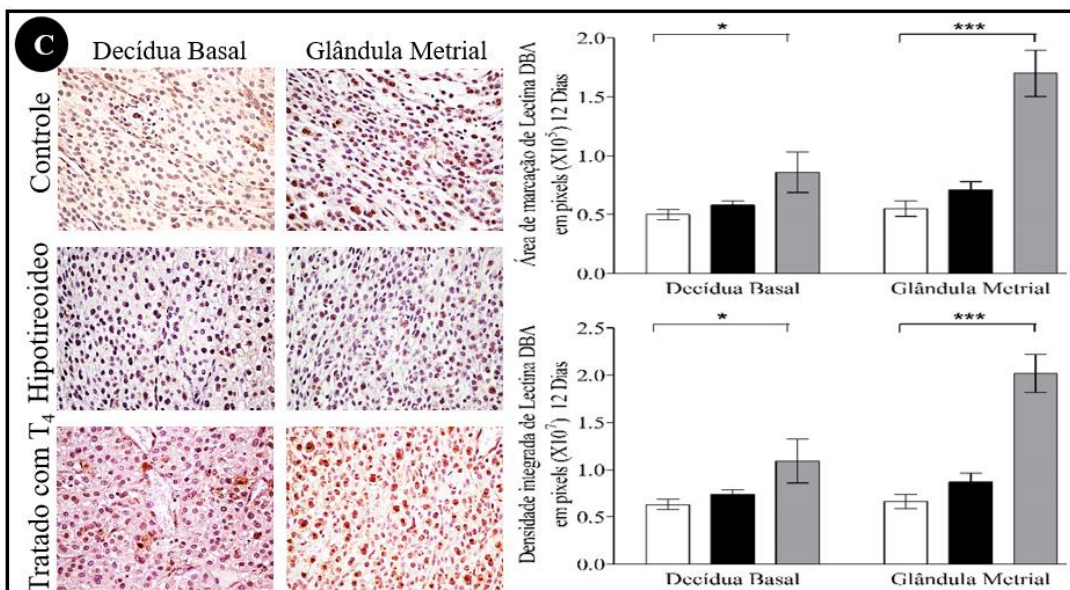
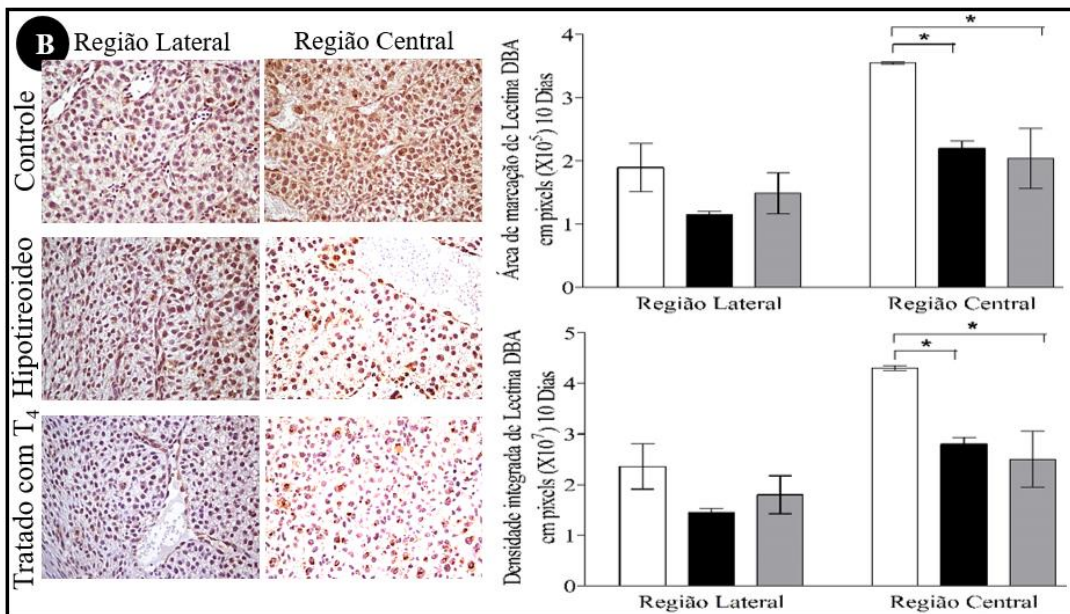
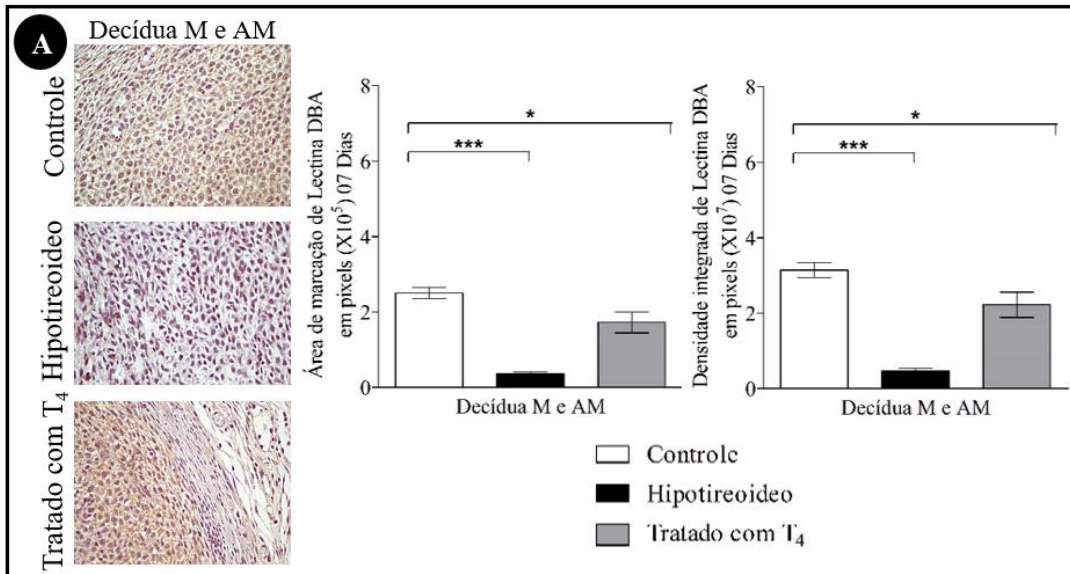


Figura 4. Detecção imunistoquímica de MIF na decídua e glândula metrial de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Decídua aos 07 DG com redução da área e intensidade de imunomarcção de MIF na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoideo e aumento no grupo tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área e densidade de imunomarcção na região lateral e central dos grupos hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub>. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com

aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal no grupo hipotireoideo e redução do grupo tratado com T<sub>4</sub> e na glândula metrial houve aumento do grupo tratado com T<sub>4</sub>, em relação ao grupo controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com aumento, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de decídua basal nos grupos hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> e aumento na glândula metrial no grupo hipotireoideo, em relação ao grupo controle. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos de tratamento nas áreas avaliadas. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de MIF na decídua de ratas aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ )



## Lectina DBA



## Lectina DBA

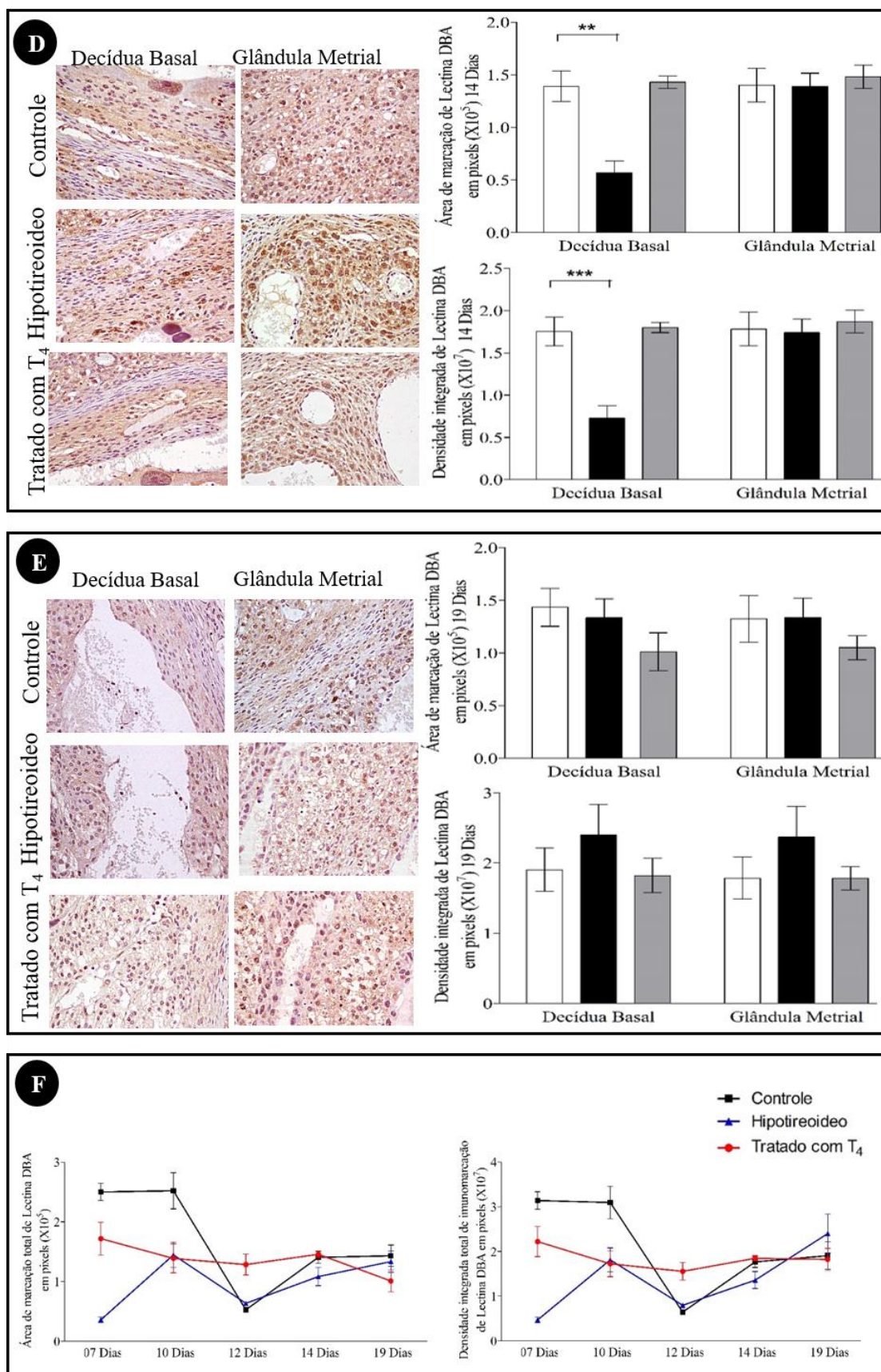


Figura 5. Detecção imunistoquímica de Lectina DBA na decídua e glândula metrial de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub>. (A) Decídua mesometrial e anti-mesometrial aos 07 DG com redução da área e

intensidade de imunomarcção de Lectina DBA na região da decídua mesometrial e anti-mesometrial no grupo hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> em comparação com o grupo controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com redução da área e densidade de imunomarcção na região central e glândula metrial dos grupos hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub>. (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG com aumento tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção na decídua basal e glândula metrial no grupo tratado com T<sub>4</sub> em relação ao grupo controle. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com redução, tanto da área quanto da intensidade de imunomarcção, na região de decídua basal no grupo hipotireoideo, em relação ao grupo controle. (E) Decídua basal e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos de tratamento nas áreas avaliadas. (F) Intensidade e área de imunomarcção total de Lectina DBA na decídua de ratas aos 07, 10, 12, 14 e 19 DG. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ )

### **5.3. Expressão gênica de *Ifny* e *iNos***

Aos 10 DG, a expressão dos transcriptos gênicos para *Ifny* (Fig. 6A; Tab. 5;  $P < 0,01$ ) e *iNos* (Fig. 6B; Tab. 5;  $P < 0,01$ ) reduziu no grupo hipotireoideo em relação ao controle. Aos 12 DG, a expressão de transcritos gênicos para *iNos* aumentou somente no grupo hipotireoideo em comparação ao controle (Fig. 6B; Tab. 5;  $P < 0,001$ ). Aos 14 DG, a expressão de transcritos gênicos para *Ifny* aumentou no grupo hipotireoideo (Fig. 6A; Tab. 5;  $P < 0,05$ ). Contudo, a expressão gênica de *iNos* reduziu (Fig. 6B; Tab. 5;  $P < 0,05$ ) em ambos os tratamentos neste período, em relação ao controle.

Aos 19 dias, tanto o hipotireoidismo quanto o tratamento com T<sub>4</sub> reduziram a expressão de *Ifny* (Fig. 6A;  $P < 0,01$ ) na decídua. Contudo, a condição de hipotireoidismo aumentou a expressão de *iNos* (Fig. 6B;  $P < 0,01$ ), em relação ao controle (Tab. 5).

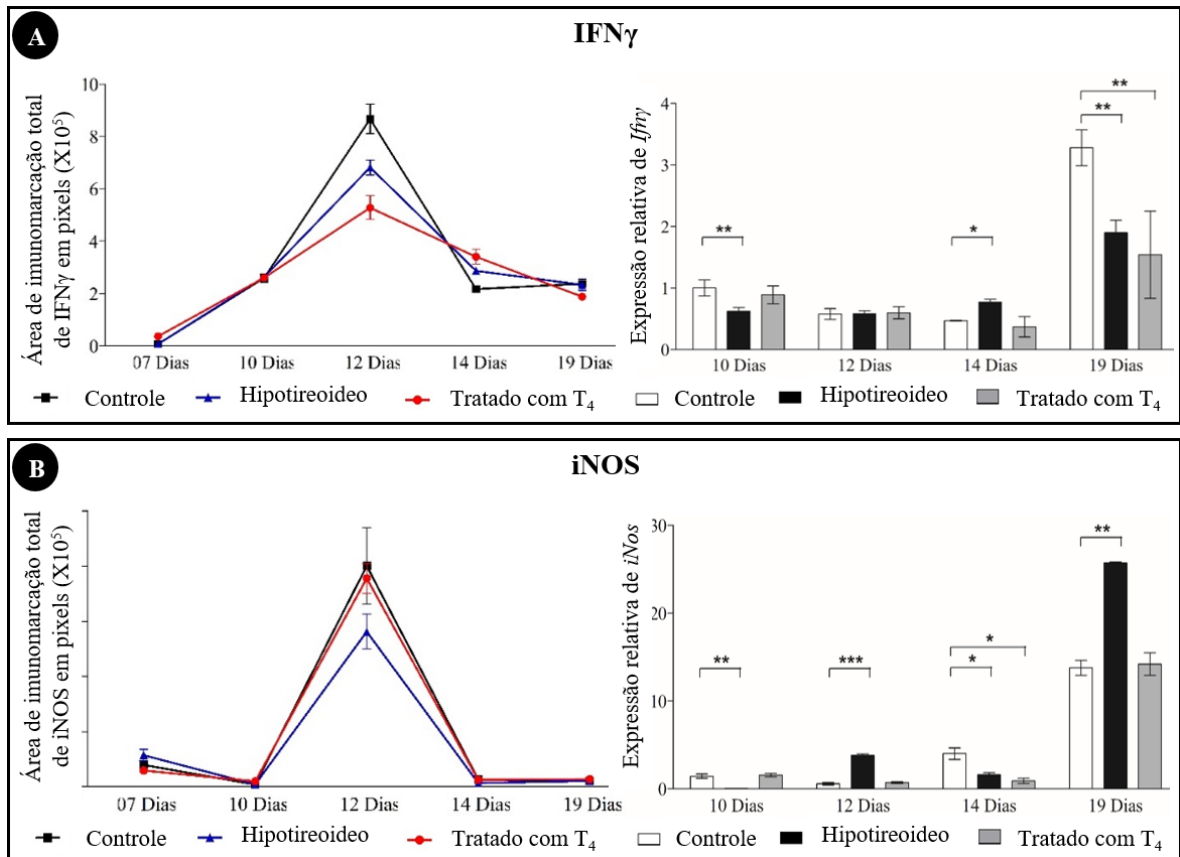


Figura 6. Detecção imunoistoquímica (gráfico de linhas) e expressão relativa gênica (gráfico de barras) de IFN $\gamma$  e iNOS na decídua de ratas dos grupos controle, hipotireoideo e tratados com T<sub>4</sub> aos 7, 10, 12, 14 e 19 DG. (A) Detecção imunoistoquímica de IFN $\gamma$  na decídua e glândula metrial evidenciando pico de expressão aos 12 DG. Expressão relativa de *Ifn $\gamma$*  apresentando redução no grupo hipotireoideo aos 10 DG, aumento aos 14 DG e redução em ambos os tratamentos aos 19 DG, em relação ao grupo controle. (B) Detecção imunoistoquímica de iNOS na decídua e glândula metrial evidenciando pico de expressão aos 12 DG. Expressão relativa de *iNos* apresentando redução no grupo hipotireoideo aos 10 DG, aumento do grupo hipotireoideo aos 12 DG, redução em ambos os tratamentos aos 14 DG e aumento do grupo hipotireoideo aos 19 DG, em relação ao grupo controle. (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

Tabela 4 – Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T<sub>4</sub> na detecção imunistoquímica de mediadores inflamatórios na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle. D- decídua; RL- região lateral; RC- região central; DB- decídua basal; GM- glândula metrial.

| Detecção Imunistoquímica |               |    |      |    |      |    |      |    |      |                            |     |    |      |    |      |    |      |    |      |  |
|--------------------------|---------------|----|------|----|------|----|------|----|------|----------------------------|-----|----|------|----|------|----|------|----|------|--|
| Mediadores Inflamatórios | Hipotireoideo |    |      |    |      |    |      |    |      | Tratado com T <sub>4</sub> |     |    |      |    |      |    |      |    |      |  |
|                          | 7 D           |    | 10 D |    | 12 D |    | 14 D |    | 19 D |                            | 7 D |    | 10 D |    | 12 D |    | 14 D |    | 19 D |  |
|                          | D             | RL | RC   | DB | GM   | DB | GM   | DB | GM   | D                          | RL  | RC | DB   | GM | DB   | GM | DB   | GM |      |  |
| IFN $\gamma$             | -             | -  | -    | ↓  | ↓    | ↑  | ↑    | -  | -    | ↑                          | -   | -  | ↓    | ↓  | ↑    | ↑  | ↓    | ↓  |      |  |
| IL15                     | -             | ↑  | -    | ↑  | ↓    | -  | -    | ↓  | -    | ↑                          | ↑   | ↑  | -    | ↓  | -    | ↓  | ↓    | -  |      |  |
| iNOS                     | ↑             | -  | -    | ↓  | ↓    | -  | ↓    | -  | ↓    | -                          | -   | ↑  | ↓    | -  | -    | -  | -    | -  |      |  |
| MIF                      | ↓             | ↑  | ↑    | ↑  | -    | ↑  | ↑    | -  | -    | ↑                          | ↑   | ↑  | ↓    | ↑  | ↑    | -  | -    | -  |      |  |
| Lectina DBA              | ↓             | -  | ↓    | -  | -    | ↓  | -    | -  | -    | ↓                          | -   | ↓  | ↑    | ↑  | -    | -  | -    | -  |      |  |

↑ achurado de rosa: aumento significativo da expressão imunistoquímica; ↓ achurado de azul: redução significativa da expressão imunistoquímica; - não houve diferença significativa na detecção imunistoquímica.

Tabela 5 – Resumo dos efeitos do hipotireoidismo e do excesso de T<sub>4</sub> na expressão gênica de mediadores inflamatórios na decídua e glândula metrial de ratas em comparação ao grupo controle.

| Expressão Gênica         |               |      |      |      |                            |      |      |      |
|--------------------------|---------------|------|------|------|----------------------------|------|------|------|
| Mediadores Inflamatórios | Hipotireoideo |      |      |      | Tratado com T <sub>4</sub> |      |      |      |
|                          | 10 D          | 12 D | 14 D | 19 D | 10 D                       | 12 D | 14 D | 19 D |
| <i>Ifny</i>              | ↓             | -    | ↑    | ↓    | -                          | -    | -    | ↓    |
| <i>iNos</i>              | ↓             | ↑    | ↓    | ↑    | -                          | -    | ↓    | -    |

↑ achurado de rosa: aumento significativo da expressão imunistoquímica; ↓ achurado de azul: redução significativa da expressão imunistoquímica; - não houve diferença significativa na detecção imunistoquímica.

## 6. Discussão

O hipotireoidismo e o tratamento com T<sub>4</sub> alteraram o perfil de expressão espaço-temporal dos fatores imunológicos na decídua e na glândula metrial de ratas ao longo da gestação. Embora, a resposta tenha sido variável dentro de cada grupo, dependendo da região e do período analisados, havendo curiosamente, em alguns períodos, a mesma resposta em ambos os grupos tratados, a redução dos fatores pró-inflamatórios IFN $\gamma$  e IL15 foi predominante no grupo tratado com T<sub>4</sub>. Em contrapartida, a redução do fator anti-inflamatório iNOS e da marcação de células uNKs DBA<sup>+</sup> foi principalmente evidenciada no grupo hipotireoideo, o que pode comprometer não somente o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal, como também o remodelamento arterial intrauterino pelas células trofoblásticas. Interessante é que efeitos semelhantes foram observados no disco placentário de ratas com hipotireoidismo e tratadas com T<sub>4</sub> (Silva *et al.*, 2014).

Aos sete DG, o hipotireoidismo aumentou a imunexpressão de iNOS e reduziu a imunexpressão MIF e a população de células uNK DBA<sup>+</sup>. O iNOS tem efeitos anti-inflamatórios e o seu aumento na interface materno-fetal está associado ao estresse oxidativo (Myatt *et al.*, 1997; Shaamash *et al.*, 2001; Leanza *et al.*, 2007). Além disso, nos animais hipotireoideos, as células uNK tiveram menor área e intensidade de imunomarcção pela lectina DBA, o que sugere menor número ou diferenciação dessas células. Esse achado pode desfavorecer tanto o perfil imunológico da interface materno-fetal quanto prejudicar o remodelamento vascular, uma vez que as células uNK estão envolvidas neste processo (Plaisier, 2011; Rätsep *et al.*, 2015).

O MIF é uma citocina multifuncional que tem sido relacionada, na interface materno-fetal, à angiogênese, à proliferação celular (Viganò *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010), à supressão da apoptose e ao aumento na síntese proteica (Faria *et al.*, 2010; Bevilacqua *et al.*, 2014). Desta forma, a redução da imunexpressão de MIF na decídua dos animais hipotireoideos poderia explicar o retardo na diferenciação dos fibroblastos intersticiais em células decíduais, a ausência do estímulo trófico dos hormônios tireoidianos (Kennedy e Doktorcik, 1988; Galton *et al.*, 2001) e a consequente redução da área da decídua aos 10 DG (Souza *et al.*, 2017).

Nas ratas tratadas com T<sub>4</sub>, houve aumento da imunexpressão de IFN $\gamma$ , IL15 e MIF, contudo houve também redução da lectina DBA, aos 7 DG. Essas citocinas são pró-inflamatórias e se autorregulam. O IFN $\gamma$ , por exemplo, aumenta a expressão de IL15 (Askar *et al.*, 2003) e de MIF (Faria *et al.*, 2010; Bevilacqua *et al.*, 2014). O efeito do hipertireoidismo sobre o disco placentário aos 10 DG promove aumento de expressão gênica de *Mmp2*, o que poderia favorecer a migração de trofoblastos neste período gestacional (Silva *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* também demonstraram aumento da expressão de IFN $\gamma$  sob efeito dos hormônios tireoidianos. As células trofoblásticas de camundongos cultivadas com T<sub>3</sub> aumentam a expressão de IFN $\gamma$  (Silva *et al.*, 2015) e as células fibroblásticas cultivadas com T<sub>4</sub> aumentam a atividade antiviral do IFN $\gamma$  em mais de 100X (Lin *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997). Sabe-se também que o IFN $\gamma$  aumenta a atividade fagocítica do citotrofoblasto e de macrófagos o que favorece a penetração do trofoblasto (Silva *et al.*, 2014). Além disso, o IFN $\gamma$  juntamente com a

IL15, sintetizados pelos fibroblastos que estão se diferenciando em células decíduais, na decídua mesometrial e anti-mesometrial, regulam a diferenciação das uNKs que chegam à decídua (Askar *et al.*, 2003).

O excesso de T<sub>4</sub> proporcionou aumento da detecção proteica de IL15 aos 7 e 10 DG. O aumento da IL15 pode favorecer a diferenciação das células uNK pois está diretamente relacionada a quimiotaxia e diferenciação destas células (Ye *et al.*, 1996; Keskin *et al.*, 2007; Kitaya *et al.*, 2003b; Acar, 2011; Erlebacher, 2013a, b; Zhang *et al.*, 2016) na região de decídua propiciando o maior desenvolvimento da vasculatura, o que foi observado em ratas com a mesma disfunção (Souza *et al.*, 2017). Além disso, o excesso de T<sub>4</sub> aumentou a imunexpressão de MIF aos 07 DG. Este fato pode aumentar a diferenciação e reduzir a taxa de apoptose das células decíduais e favorecer a migração de uNKs para a decídua (Faria *et al.*, 2010; Bevilacqua *et al.*, 2014) que neste trabalho foi evidenciado aos 12 DG.

Aos 10 DG, o hipotireoidismo aumentou a imunexpressão de IL15 e MIF, mas reduziu a expressão de lectina DBA, além de reduzir a transcrição gênica de *Ifn $\gamma$*  e *iNos*. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Silva e colaboradores (2014). O IFN $\gamma$  influencia diretamente a função das células uNK que estão envolvidas tanto na imunidade quanto na dinâmica vascular placentária e decidual (Hu e Cross, 2010). Além disso, o IFN $\gamma$  está relacionado a atividade fagocítica de macrófagos, importante para a diferenciação do trofoblasto durante o período de diferenciação do cone ectoplacentário (Leanza *et al.*, 2007). Portanto, a expressão reduzida de *Ifn $\gamma$*  pode ter sido a causa do subdesenvolvimento da decídua observado por Souza e colaboradores (2017) em animais com hipotireoidismo. O IFN $\gamma$  sintetizado pelas células uNK interfere com a função imune decidual e modifica a expressão de genes pelas células endoteliais e estromais e pelos miócitos, favorecendo o início do remodelamento vascular na decídua (Ashkar *et al.*, 2000; Hu e Cross, 2010). Mas a redução do IFN $\gamma$  poderia implicar em retardo do remodelamento vascular prejudicando a vascularização decidual e ser a causa do retardo da diferenciação dos fibroblastos intersticiais em células decíduais (Kennedy e Doktorcik, 1988; Galton *et al.*, 2001). Estes fatos conjuntamente agravariam ainda mais o comprometimento da decídua e justificaria o baixo peso fetal e placentário apresentado por animais com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2012).

O aumento da IL15 na região lateral da decídua mesometrial dos animais hipotireoideos aos 10 DG pode ter ocorrido pelo fato que é também observado neste mesmo período o acúmulo de uNKs na região central de ratas gestantes, bem como sua diferenciação (Bilinsk *et al.*, 2008). Contudo, este fato não foi observado em nenhum dos grupos de tratamentos uma vez que houve a redução das uNKs DBA<sup>+</sup>, fato este que não pode ser explicado. A IL15 além do seu papel pró-inflamatório também promove a mudança no fenótipo das células NK para as células uNK que têm morfologia e funcionalidade peculiares durante a gestação (Keskin *et al.*, 2007; Kitaya *et al.*, 2003b; Acar, 2011, Erlebacher, 2013a e b). Contudo, a IL15 não só aumenta a multiplicação e a diferenciação da uNK, como também é responsável por aumentar a atividade citolítica dessas células (Clifford *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 2000; Strbo *et al.*, 2006). O aumento da expressão de IL15 acima do fisiológico poderia exacerbar a atividade citolítica da uNK

prejudicando o desenvolvimento embrionário e fetal e ser um dos fatores pelo qual se explica a redução da migração das células trofoblásticas na decídua de ratas com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2014). Vale ressaltar que a população de células uNK tem fenótipo variado (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). Existem subtipos de uNK, algumas são PAS<sup>+</sup> (Periodic Acid Schiff) DBA<sup>-</sup> e outras são PAS<sup>+</sup>DBA<sup>+</sup> (Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2016). Existem protocolos que contemplam as duas marcações concomitantemente e permitem uma análise dos subtipos das células uNK (Zhang *et al.*, 2009). Este fato pode ter ocorrido pelo aumento de células uNK DBA<sup>-</sup>, que não foram avaliadas neste estudo.

O excesso de T<sub>4</sub> aos 10 DG aumentou a imunoposição de IL15, iNOS e de MIF, mas reduziu a marcação das uNKs DBA<sup>+</sup>. A IL15 está envolvida na quimiotaxia, multiplicação e diferenciação das células uNK (Ye *et al.*, 1996; Verma *et al.*, 2000). Entretanto, a marcação para lectina DBA reduziu neste período. Pode ser que o aumento da IL15 tenha favorecido o aumento de células uNK PAS<sup>+</sup>DBA<sup>-</sup> que não foram avaliadas no presente estudo.

O aumento da imunoposição de iNOS aos 10 DG no grupo tratado com T<sub>4</sub> pode ser um dos fatores a ser considerado para explicar o estímulo ao remodelamento vascular decidual que ocorre neste período gestacional (Plaisier, 2011). O que resultou no aumento do número de vasos na decídua no mesmo período em animais com a mesma condição metabólica (Souza *et al.*, 2017). O iNOS é um potente relaxante da musculatura lisa de vasos sanguíneos e da musculatura estriada. Normalmente o iNOS aumenta no terço médio da gestação e reduz ao final, como observado no presente estudo e por isso, juntamente com sua ação sobre a musculatura acredita-se que ele seja um dos responsáveis por manter o útero quiescente durante a gestação (Dong *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2017).

Aos 12 DG, nos animais hipotireoideos, foi observada redução da imunoposição de IFN $\gamma$  e iNOS e o aumento de IL15, de MIF e da expressão gênica de *iNos*. Estudos anteriores demonstraram que o IFN $\gamma$ , além de ativar macrófagos deciduais, na interface materno-fetal, também induz a síntese de iNOS pelos trofoblastos fetais (Hioshida *et al.*, 2007). A redução de imunomarcção de iNOS em animais hipotireoideos foi observada aos 12, 14, e 19 DG e a redução da expressão gênica foi observada aos 10 DG. Contudo, houve períodos em que o seu aumento também foi observado no hipotireoidismo, como aos 7 DG, na detecção proteica, e aos 12 e 19 DG na expressão dos transcritos gênicos. A redução do iNOS tem sido associada à pré-eclâmpsia e a restrição de crescimento intrauterino (Liao *et al.*, 1996). O tratamento de ratas gestantes com inibidor de iNOS resulta em sintomas semelhantes ao pré-eclâmpsia (Liao *et al.*, 1997). Isso ocorre porque o iNOS promove o relaxamento muscular e na sua ausência haveria aumento da pressão dos vasos sanguíneos e da contração uterina (Liao *et al.*, 1997). Segundo Purcell e colaboradores (1997), o iNOS presente na placenta de ratas está relacionado aos níveis de progesterona materno. Sabe-se que ratas com hipotireoidismo geralmente apresentam níveis elevados de progesterona (Hatsuta *et al.*, 2004) e este fato pode ter favorecido a redução dos níveis de iNOS em praticamente todos os períodos gestacionais, da proteína e dos transcritos gênicos. Além disso, a progesterona é o hormônio com maior efeito na tensão vascular ao longo da gestação em ratas (Lião *et al.*, 1996). Outro fato interessante e que corrobora com os achados



do presente estudo, é que macrófagos de ratas sobre influência de altas doses de progesterona apresentam redução da expressão de iNOS (Miller *et al.*, 1996).

O hipotireoidismo resultou na elevação da proteína IL15 aos 10 e 12 DG, na região lateral e decídua basal respectivamente, e reduziu na glândula metrial aos 12 DG. Nestes períodos, naturalmente tem-se maior concentração das células uNK na decídua e na glândula metrial, bem como sua diferenciação e, conseqüentemente, maior remodelamento vascular (Burnett e Hunt, 2000; Croy *et al.*, 2007; Picut *et al.*, 2009; Plaisier, 2011). A IL15 regula a diferenciação das células uNKs na glândula metrial de camundongos gestantes (Ye *et al.*, 1996; Keskin *et al.*, 2007; Kitaya *et al.*, 2003b; Acar, 2011; Erlebacher, 2013a,b; Zhang *et al.*, 2016). Foi visto que o cultivo de explantes de decídua de camundongos juntamente com a IL15 aumenta a expressão de perforina, uma molécula citotóxica (Burnett e Hunt, 2000), pelas células uNKs mais expressivamente próximo aos oito DG (Ye *et al.*, 1996; Strbo *et al.*, 2006).

Aos 12 DG, a redução proteica do IFN $\gamma$  foi observada tanto no grupo hipotireoideo quanto no tratado com T<sub>4</sub>. No disco placentário, foi observada redução de imunomarcagem de IFN $\gamma$  aos 14 e 19 DG no espongiotrofoblasto e redução de transcritos gênicos aos 10 e 14 DG em ratas com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2014). A redução da síntese de IFN $\gamma$  na interface materno fetal pode ter efeito negativo no desenvolvimento placentário e decidual. O IFN $\gamma$  influencia diretamente a função das uNK que estão envolvidas na função imune e na dinâmica vascular placentária e decidual (Ashkar *et al.*, 2000; Hu e Cross, 2010). Camundongos *knockout* para IFN $\gamma$  e seu receptor ou sem leucócitos apresentam tecido decidual subdesenvolvido (Ashkar *et al.*, 2000). Estes indivíduos quando tratados com IFN $\gamma$  recombinante podem ter um remodelamento vascular mais próximo do normal e um melhor desenvolvimento decidual (Monk *et al.*, 2005). Outro fato que reforça essa afirmativa é que animais com hipotireoidismo apresentam intenso comprometimento vascular na placenta e com redução do peso fetal (Silva *et al.*, 2012). Por outro lado, observou-se que no grupo tratado com T<sub>4</sub> houve o aumento da marcação para lectina DBA e, portanto, seria esperado o aumento da síntese de IFN $\gamma$ . Entretanto, neste grupo, houve redução do IFN $\gamma$ , bem como da IL15, iNOS e MIF na decídua basal ou glândula metrial aos 12 DG. O aumento da marcação para lectina DBA nos animais tratados com T<sub>4</sub> pode ter sido devido a ação da IL15 aos 7 e 10 dias e do IFN $\gamma$  aos 7 DG que estavam aumentados nestes animais, resultando em maior migração e diferenciação das células uNK aos 12 DG. Entretanto, o MIF teve aumento de sua imunomarcagem na glândula metrial aos 12 DG nos animais tratados com T<sub>4</sub>. Neste período há o remodelamento vascular na decídua, finalização da formação da placenta e início da migração trofoblástica endovascular (Faria *et al.*, 2010). Isso porque ele está associado ao estímulo da migração celular, maturação, supressão da apoptose e síntese de proteínas celulares (Bevilacqua *et al.*, 2014). Este fato pode ter corroborado para o aumento do número de fetos em ratas com excesso de T<sub>4</sub> (Freitas *et al.*, 2007).

Aos 14 DG, tem-se o ponto máximo do desenvolvimento vascular da decídua e da glândula metrial (Picut *et al.*, 2009; Plasier, 2011). Neste período foi observado nos animais hipotireoideos o aumento da expressão proteica de IFN $\gamma$ , MIF e redução de iNOS e das células

uNK DBA<sup>+</sup>. Além do aumento da transcrição gênica de *Ifn $\gamma$*  e *Il15* e redução do *iNos*. O aumento do IFN $\gamma$  é oposto ao resultado observado no disco placentário de ratas com hipotireoidismo no mesmo período gestacional, nas quais há redução de expressão gênica e proteica de IFN $\gamma$  (Silva *et al.*, 2014). As ratas com excesso de T<sub>4</sub> apresentaram comportamento semelhante no que diz respeito ao aumento da detecção proteica de IFN $\gamma$  nas regiões de decídua basal e glândula metrial. Estudos demonstraram que o excesso de IFN $\gamma$  em cultura de células trofoblásticas pode prejudicar a capacidade de infiltração destas células na decídua (Fontana *et al.*, 2010). O aumento de MIF aos 14 DG observado em ratas gestantes hipotireoideas (Silva *et al.*, 2014) pode ter sido a causa do aumento de IFN $\gamma$  e a redução de iNOS comprometendo o ambiente anti-inflamatório. Estes fatos conjuntamente poderiam ser a explicação para abortos recorrentes em algumas mulheres com hipotireoidismo subclínico (Fontana *et al.*, 2010). Além disso, células trofoblásticas humanas cultivadas em meio com IFN $\gamma$  têm o seu crescimento inibido e apresentam alterações degenerativas (Haimovici *et al.*, 1991; Raghupathy, 1997). Outro fato interessante é que ratas gestantes aumentam a apoptose e a expressão de *Toll-like receptors 2* em células trofoblásticas (Silva *et al.*, 2014). Abortos em camundongos com infecção por *Brucella* spp. foram atribuídos ao aumento transiente de IFN $\gamma$  (Kim *et al.*, 2005). Estes fatos conjuntamente explicam a reduzida capacidade de migração do trofoblasto endovascular e intersticial observados em ratas com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2014). E pode-se dizer que o aumento do IFN $\gamma$  acima do fisiológico produz efeitos deletérios durante a gestação. Contudo, esses efeitos deletérios não foram observados no grupo tratado com T<sub>4</sub>, apesar de também ter havido o aumento do IFN $\gamma$ . Isso pode ter ocorrido pela interação ou não com outros fatores, como pelo próprio perfil de expressão de receptores para o IFN $\gamma$  que pode aumentar por exemplo a atividade fagocítica de trofoblastos (Albieri *et al.*, 2005) melhorando a migração endovascular e resultando em um maior disponibilidade de nutrientes para o feto.

Aos 14 DG inicia a regressão da decídua e o número de células uNK começa a declinar (Croy *et al.*, 2007; Picut *et al.*, 2009). Assim, há redução natural da IL15 que é observada do dia 12 para o dia 14 de gestação. Entretanto, no grupo tratado com T<sub>4</sub> essa redução foi mais intensa na região de glândula metrial. Este fato pode ser devido ao aumento de IL15 aos 7 e 10 DG nas regiões laterais e centrais da decídua das ratas tratadas com T<sub>4</sub>, que por sua vez resultou na maior diferenciação das células uNK aos 12 DG, evidenciada pela marcação da lectina DBA. As células uNK têm sua maior diferenciação aos 12 DG em camundongos entrando em processo degenerativo após este período (Croy *et al.*, 1997). O que pode ter ocorrido é que no grupo tratado com T<sub>4</sub> a diferenciação foi maior aos 12 dias e posteriormente as células uNK podem ter entrado em senescência mais precocemente aos 14 dias.

Aos 19 DG, o hipotireoidismo resultou em redução de IL15, na decídua basal, iNOS, na glândula metrial, e de transcritos gênicos para *Ifn $\gamma$*  e aumento de *iNos*. Neste momento há regressão da decídua basal e da glândula metrial, com presença de células uNK degeneradas (Picut *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2017). Normalmente há aumento de iNOS ao longo da gestação e redução ao final (Dong *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 1998), como confirmado pelo presente trabalho. Entretanto, observou-se que no grupo hipotireoideo há aumento da transcrição gênica que poderia aumentar posteriormente, mais próximo ao parto, a expressão proteica de iNOS

criando um ambiente anti-inflamatório e desta forma provocar o atraso no parto observado em animais com hipotireoidismo (Hapon *et al.*, 2003). Isso porque o iNOS promove o relaxamento da musculatura do útero durante a gestação e permite que não haja perda embrionária e fetal pois mantém o útero quiescente (Dong *et al.*, 1998).

O excesso de T<sub>4</sub> proporcionou, aos 19 DG, a redução da detecção proteica de IFN $\gamma$  e IL15 e do transcrito gênico de IFN $\gamma$ . Esses achados são contrários ao observado no labirinto placentário de ratas com excesso de T<sub>4</sub> no mesmo período gestacional (Silva *et al.*, 2014). Foi sugerido que o aumento de IFN $\gamma$  no labirinto placentário nos animais tratados com T<sub>4</sub>, aos 19 DG, estivesse relacionado com o parto prematuro desses indivíduos (Silva *et al.*, 2014). Isso ocorreria pois para que o parto ocorra é necessário um aumento da população de células inflamatórias na região de decídua que auxiliaria na contração uterina (Koga *et al.*, 2009). Contudo, há redução do IFN $\gamma$  tanto na decídua basal quanto na glândula metrial no grupo tratado com T<sub>4</sub>. Essa redução pode ser consequência do menor número de trofoblastos endovasculares aos 18 DG em animais com excesso de T<sub>4</sub> (Silva *et al.*, 2014), uma vez que estas células são a principal fonte de IFN $\gamma$  na região da decídua, além das células uNKS (Cencic e La Bonnardière, 2002; Hoshida *et al.*, 2007).

## 7. Conclusões

Conclui-se que tanto o hipotireoidismo quanto o tratamento com tiroxina alteram o perfil de expressão espaço-temporal dos fatores imunológicos da decídua e da glândula metrial ao longo da gestação. A redução dos fatores pró-inflamatórios IFN $\gamma$  e interleucina 15 é mais predominante no grupo tratado com T<sub>4</sub>, enquanto o hipotireoidismo compromete o desenvolvimento de um desequilíbrio favorecendo o ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal e a migração de células uNK, uma vez que a redução do fator anti-inflamatório iNOS e das células uNK DBA<sup>+</sup> é principalmente evidenciada neste grupo. Com relação ao MIF, ambos os tratamentos elevam sua expressão dos 10 aos 14 DG. Vale ressaltar que todas essas alterações ocorreram com maior intensidade entre 12 e 14 DG, período esse de maior remodelamento vascular e mais crítico para o desenvolvimento placentário.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hormônios tireoidianos atuam diretamente na interface materno-fetal tanto na mulher quanto nos animais domésticos. Distúrbios séricos desses hormônios são relacionados a desordens reprodutivas ou até mesmo infertilidade. Os resultados encontrados na realização deste trabalho demonstraram, pela primeira vez, que os casos de aborto, restrição de crescimento intrauterino, natimortalidade e parto tardio em ratas com hipotireoidismo e a maior taxa de gestação e parto prematuro observados em ratas com excesso de  $T_4$  podem ser decorrentes das alterações no perfil de citocinas inflamatórias, células uNK, fatores de crescimento e hormônios envolvidos na região de decídua e glândula metrial na interface materno-fetal.

Demonstrou-se, por exemplo, que não somente a expressão de transcritos gênicos como também a detecção proteica, através da imunistoquímica, de algumas citocinas e fatores de crescimento são alteradas nas disfunções tireoidianas. Essas variações foram espaço-temporal, ou seja, dependente do período gestacional e da região da interface materno-fetal avaliada. Para ilustrar, temos que há redução da detecção de  $INF\gamma$  em ambos os tratamentos aos 12 dias de gestação, o que é revertido aos 14 dias, quando observamos o aumento em ambos os grupos experimentais. Já aos 19 dias somente o grupo tratado com  $T_4$  sofre uma redução na detecção imunistoquímica para  $INF\gamma$ , mas ambos os grupos experimentais sofrem redução na expressão gênica deste fator.

Essas oscilações entre os dias 10 e 14 de gestação, período no qual há intenso remodelamento vascular na decídua e mais crítico no desenvolvimento placentário, visando a melhoria da nutrição fetal, observou-se o aumento de Flk-1, receptor para VEGF e PlGF, de IL15, iNOS, MIF e maior quantidade de células uNK no grupo tratado com  $T_4$ . Este fato pode estar associado ao aumento do número de vasos por campo e pode ser a justificativa de aumento da taxa de concepção, sem alterar a viabilidade fetal, encontrada em trabalhos anteriores realizados por nossa equipe de pesquisadores. Por outro lado, no grupo hipotireoideo, apesar de haver aumento, por vezes, de fatores angiogênicos e de citocinas que promoveriam maior diferenciação de células uNK e vascular, foi visto que este fato não ocorre. O que se observa no grupo hipotireoideo é a redução da área de decídua, aos 10 e 19 DG, e menor marcação para células uNK, menor detecção proteica de  $INF\gamma$ , iNOS e IL15 (glândula metrial) aos 12 DG, além do aumento de VEGF, Flk-1,  $INF\gamma$  aos 14 DG, IL15 aos 10 e 12 (decídua basal) DG e MIF aos 10, 12 e 14 DG. Estes fatos corroboram com os achados de menor número de fetos, maior desuniformidade de peso que seriam condições compatíveis com o quadro de restrição de crescimento intrauterino observado em fêmeas gestantes com hipotireoidismo. Esses achados do grupo hipotireoideo na decídua associados aos achados no disco placentário, avaliados em outro experimento realizado por nossa equipe, dão indícios de ter uma associação com estresse oxidativo. Desta forma há uma necessidade futura de se avaliar o estresse oxidativo na região da interface materno-fetal frente aos distúrbios da tireoide.

Sendo assim, podemos concluir que o tratamento com  $T_4$  resulta em um melhor ambiente decidual e da glândula metrial por aumentar a vascularização que deve estar associado a maior diferenciação das células uNK e expressão de IL15 e de MIF. Já o hipotireoidismo, reduz a área

de decídua, por redução da diferenciação de células decíduais e pela redução do número e diferenciação de células uNK DBA<sup>+</sup>, prejudicando o remodelamento vascular e criando um ambiente menos favorável a nutrição e desenvolvimento fetal, além do comprometimento do ambiente anti-inflamatório durante o desenvolvimento placentário.

## BIBLIOGRAFIA

- ABOAGYE-MATBIESEN, G.; TÓTH, F.D.; ZDRAVKOVIC, M.; *et al.* Functional Characteristics of Human Trophoblast Interferons. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.35, n.4, p.309–317, 1996.
- ABRAHAMS, V.M.; BOLE-ALDO, P.; KIM, Y.M.; *et al.* Divergent Trophoblast Responses to Bacterial Products Mediated by TLRs. *The Journal of Immunology*, v.173, p.4286-4296, 2004.
- ABRAHAMS, V.M.; VISINTIN, I.; BOLE-ALDO, P.; *et al.* A Role for TLRs in the Regulation of Immune Cell Migration by First Trimester Trophoblast Cells. *The Journal of Immunology*, v.175, p.8096-8104, 2005.
- ACAR, N.; USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine natural killer ( uNK ) cells and their missions during pregnancy : A review. *Acta Histochemica*, v.113, n.2, p.82–91, 2011.
- ACKERMAN, W.E.; BULMER, J.N.; CARTER, A.M.; *et al.* IFPA Meeting 2011 workshop report III: Placental immunology; epigenetic and microRNA-dependent gene regulation; comparative placentation; trophoblast differentiation; stem cells. *Placenta*, v.33, Suppl. A., v.26, p.S15-S22, 2012.
- ADAMSON, S.L.; LU, Y.; WHITELEY, K.; *et al.* Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Developmental Biology*, v.250, p.358–373, 2002.
- ADELMAN, D.M.; GERTSENSTEIN, M.; NAGY, A.; *et al.* Placental cell fates are regulated *in vivo* by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes and development*, v.14, p.3191-3203, 2000.
- ADELMAN, D.M.; GERTSENSTEIN, M.; NAGY, A.; *et al.* Placental cell fates are regulated *in vivo* by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes and Development*, v.14, p.3191-3203, 2000.
- AFONSO, S.; ROMAGNANO, L.; BABIARZ, B. Expression of cathepsin proteinases by mouse trophoblast *in vivo* and *in vitro*. *Developmental Dynamics*, v.216, p.374-384, 1999.
- AFONSO, S.; ROMAGNANO, L.; BABIARZ, B. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development*, v.124, p.3415-3425, 1997.
- AFONSO, S.; TOVAR, C.; ROMAGNANO, L.; *et al.* Control and Expression of Cystatin C by Mouse Decidual Cultures. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.155-163, 2002.
- AHMED, A.; DUNK, C.; AHMAD, S.; *et al.* Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placental Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen- A Review. *Placenta*, v.21, Suppl. A, 14, S16-S24, 2000.
- AIN, R. CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intratuterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental Biology*, v.260, p.176-190, 2003a.
- AIN, R.; TASH, J.S.; SOARES, M.J. Prolactin-like protein-A is a functional modulator of natural killer cells at the maternal-fetal interface. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.204, p.65-74, 2003b.
- AKTURK, M.; ORUC, A.S.; DANISMAN, N.; *et al.* Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter and Type 3 Iodothyronine Deiodinase Gene Expression in Amniotic Membrane and Placenta and Its Relationshipl to Maternal Thyroid Hormones. *Biological Trace Element Research*, v.154, p.338-344, 2013.
- ALBERTSSON, P.; KIM, M.H.; JONGES, L.E.; *et al.* Matrix metalloproteinases of human NK cells. *In Vivo*, v.14,n.1, p.269-276, 2000.
- ALBIERI, A.; HOSHIDA, M.S.; GAGIOTI, S.M.; *et al.* Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.34, n.3, p. 1-11, 2005.
- ALEXANDER, C.M.; HANSELL, E.J.; BEHRENDTSEN, O.; *et al.* Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, v.122, p.1723-1736, 1996.

- AMIN, M. A. Migration Inhibitory Factor Mediates Angiogenesis via Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol Kinase. *Circulation Research*, v.93, n.4, p.321–329, 2003.
- ANDRAWEERA, P.H.; DEKKER, G.A.; LAURENCE, J.A.; *et al.* Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, v.33, p.467-472, 2012.
- APLIN, J.D. Adhesion molecules in implantation. *Reviews of Reproduction*, v.2, p.84-93, 1997.
- APLIN, J.D. e KIMBER, S.J. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.48, n.2, p.1-12, 2004.
- APLIN, J.D.; LACEY, H.; HAIGH, T.; *et al.* Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochemical Society Transactions*, v.28, part2, p.199-202, 2000.
- APPS, R.; GARDNER, L.; MOFFETT, A. A critical look at HLA-G. *Trends in Immunology*, v.29,n.7, p.313-321, 2008.
- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; CARDUCCI, A.; *et al.* Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*, v.131, n.1, p.175–182, 2006.
- ARIYARATNE, H.B.S.; MASON, J.I.; MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C. Effects of Thyroid and Luteinizing Hormones on the Onset of Precursor Cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis. *Biology of Reproduction*, v.63, p.898-904, 2000.
- ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon  $\gamma$  Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy. *The Journal of Experimental Medicine*, v.192, n.2, p.259–270, 2000.
- ASHKAR, A.A. e CROY, A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Immunology*, v.13, p.235-241, 2001.
- ASHKAR, A.A. e CROY, B.A. Interferon- $\gamma$  contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biology of Reproduction* v.61, p.493-502, 1999.
- ASHKAR, A.A.; BLACK, G.P.; WEI, Q. *et al.* Assessment of Requirements for IL15 and INF Regulatory Factors in Uterine NK Cell Differentiation and Function During Pregnancy. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 2937-2944, 2003.
- ASKELUND, K.; LIDDELL, H.S.; ZANDERIGO, A.M.; *et al.* CD83<sup>+</sup> Dendritic Cells in the Decidua of Women with Recurrent Miscarriage and Normal Pregnancy. *Placenta*, v.25, p.140-145, 2004.
- AYALA, C.; VALDEZ, S.R.; MORERO, M.L.N.; *et al.* Hypo- and hyperthyroidism affect NEI concentration in discrete brain areas of adult male rats. *Peptides*, v.32, p.1249-1254, 2011.
- BAINES M.G.; DUCLOS, A.J.; ANTECKA, E.; *et al.* Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.37, p.471-477, 1997.
- BAKER, J.; LIU, J.P.; ROBERTSON, E.J.; *et al.* Role of Insulin-like Growth Factors in Embryonic and Postnatal Growth. *Cell*, v.75, p.73-82, 1993.
- BALBÍN, M.; FUEYO, A.; KNÄUPER, V.; *et al.* Identification and Enzymatic Characterization of Two Diverging Murine Counterparts of Human Interstitial Collagenase (MMP-1) Expressed at Sites of Embryo Implantation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.13, p.10253-10262, 2001.
- BANOVAC, K.; RYAN, E.A.; O'SULLIVAN, M.J. Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) nuclear binding sites in human placenta and decidua. *Placenta*, v.7, p.543-549, 1986.
- BANY, B.M. e CROSS, J.C. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Developmental Biology*, v.294, p.445-456, 2006.



- BANY, B.M. e SCHULLTZ, G.A. Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-3 Expression in the Mouse Uterus During Implantation and Artificially Induced Decidualization. *Molecular Reproduction and Development*, v.59, p.159-167, 2001.
- BARBER, K.J.; FRANKLYN, J.A.; McCABE, C.J.; *et al.* The in vitro effects of triiodothyronine on epidermal growth factor-induced trophoblast function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.90, n.3, p.1655-1661, 2005.
- BARKER, D.J. e CLARK, P.M. Fetal undernutrition and disease in later life. *Reviews of Reproduction*, v.2, p.105-112, 1997.
- BARRIENTOS, G.; TIRADO-GONZÁLEZ, I.; KLAPP, B.F.; *et al.* The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal-maternal interface. *Journal of Reproductive Immunology*, v.83, p.85-94, 2009.
- BATES, J.M.; St. GERMAIN, D.L.; GALTON, V.A. Expression Profiles of the Three Iodothyronine Deiodinases, D1, D2, and D3, in the Developing Rat. *Endocrinology*, v.140, n.2, p.844-851, 1999.
- BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; *et al.* Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, v.138, n. 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.
- BELL, S.C. Decidualization and associated cell types: Implications for the role of the placental bed in the materno-fetal immunological relationship. *Journal of Reproductive Immunology*, v.5, p.185-194, 1983.
- BELL, S.C. e SEARLE, R.F. Differentiation of decidual cells in mouse endometrial cell cultures. *The Journal of Reproduction and Fertility*, v.61, p.425-433, 1981.
- BELL, S.C. Immunochemical identity of 'decidualization-associated protein and  $\alpha 2$  acute-phase macroglobulin in the pregnant rat. *Journal of Reproductive Immunology*, v.1, p.193-206, 1979.
- BELL, S.C.; HALES, Y.W.; PATEL, S.; *et al.* Protein synthesis and secretion by the human endometrium and decidua during early pregnancy. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.92, n.8, p.793-803, 1985.
- BENSON, G.V.; LIM, H.; PARIÁ, B.C.; *et al.* Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice\_uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development*, v.122, p.2687-2696, 1996.
- BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.; FERRO, E.A.V.; *et al.* Review: Putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. *Placenta*, v.35, n.SUPPL, p.S51-S56, 2014.
- BIGGERS, J.D.; BASKAR, J.F.; TORCHIANA, D.F. Reduction of fertility of mice by the intrauterine injection of prostaglandin antagonists. *The Journal of Reproduction and Fertility*, v.63, p.365-372, 1981.
- BILINSK, M.J.; THORME, J.G.; OH, M.J.; *et al.* Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reproductive BioMedicine Online*, v.16, n.2, p.218-226, 2008.
- BISCHOF, R.J.; BRANDON, M.R.; LEE, C-S. Cellular immune responses in the pig uterus during pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, v.29, p.161-178, 1995.
- BISCHOF, R.J.; BRANDON, M.R.; LEE, C-S. Studies on the distribution of immune cells in the uteri of prepubertal and cycling gilts. *Journal of Reproductive Immunology*, v.26, p.111-129, 1994.
- BISHOP, D.W. *Sperm physiology in relation to the oviduct*. In: HAFEZ, E. S. E.; BLANDAUI, R. J. The mammalian oviduct: comparative biology and methodology. Chicago: University of Chicago Press, 1969. cap.9, p. 231-250.
- BLANKENSHIP, T.N. e GIVEN, R.L. Penetration of the uterine epithelial basement membrane during blastocyst implantation in the mouse. *The Anatomical Record*, v.233, p.196-204, 1992.

- BLOIS, S.M.; KLAPP, B.F.; BARRIENTOS, G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the function of DC and NK cells. *Journal of Reproductive Immunology*, v.88, p.86-92, 2011.
- BLOIS, S.M.; SOTO, C.D.A.; TOMETTEN, M.; *et al.* Lineage Maturity and Phenotype of Uterine Murine Dendritic Cells Throughout Gestation Indicate a Protective Role in Maintaining Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1018-1023, 2004.
- BONDARENKO, G.I.; DUMING, M.; GOLOS, T.G. Immunomorphological changes in the rhesus monkey endometrium and decidua during the menstrual cycle and early pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.68, p.309-321, 2012.
- BONEN, A.; HEYNEN, M.; HATTA, H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v.31, p.31-39, 2006.
- BOULOGNE, B.; HABERT, R.; LEVACHER, C. Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells. *Molecular Reproduction and Development*, v.65, p.194-203, 2003.
- BOYSON, J.E.; AKTAN, I.; BARKHYFF, D.A.; *et al.* NKT cells at the maternal-fetal interface. *Immunological Investigation*, v.37, p.565-582, 2008.
- 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.
- BROSENS, I.; ROBERTSON, W.B. DIXONS, H.G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v.93, n.2, p.569-579, 1967.
- BROWN, M.B.; VON CHAMIER, M.; ALLAM, A.B; *et al.* M1/M2 Macrophage Polarity in Normal and Complicated Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v.5, art.606, 1-10, 2014.
- BULMER, D.; PEEL, S.; STEWART, I. The Metrial Gland. *Cell Differentiation*, v.20, p.77-86, 1987.
- BULMER, J.N.; PACE, D.; RITSON, A. Immunoregulatory cells in human decidua: morphology, immunohistochemistry and function. *Reproduction Nutrition Development*, v.28, n.6B, p.1599-1614, 1988.
- BULMER, J.N. e LASH, G.E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. *Molecular Immunology*, v.42, p.511-521, 2005.
- BULMER, J.N.; MORRISON, L.; LONGFELLOW, M.; *et al.*, Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human Reproduction*, v.6, n.6, p.791-798, 1991.
- BURAS, A.; BATTLE, L.; LANDERS, E.; *et al.* Thyroid hormones regulate anxiety in male mouse. *Hormones and Behavior*, v.65, p.88-96, 2014.
- BURKE, S.D.; BARRETTE, V.F.; GRAVEL, J.; *et al.* Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p.472-481, 2010.
- BURNETT, T.G. e HUNT, J.S. Nitric Oxide Synthase-2 and Expression of Perforin in Uterine NK Cells. *The Journal of Immunology*, v.164, p.5245-5250, 2000.
- BURROWS, T.D.; KING, A.; LOKE, Y.W. Expression of Adhesion Molecules by Human Decidual Large Granular Lymphocytes. *Cellular Immunology*, v.147, p.81-94, 1993.
- BURROWS, T.D.; KING, A.; LOKE, Y.W. Expression of Adhesion Molecules by Endovascular Trophoblast and Decidual Endothelial Cells: Implications for Vascular Invasion During Implantation. *Placenta*, v. 15, p.21-33, 1994.
- BURROWS, T.D.; KING, A.; LOKE, Y.W. Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update*, v.2, n.4, p.307-321, 1996.

- BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E.; WATSON, A.L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: The Boyd Collection revisited. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, v.181, n.3, p.718-724, 1999.
- BURTON, G.J.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; *et al.* Uterine Glands Provide Histiotrophic Nutrition for the Human Fetus during the First Trimester of Pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.87, p.2954-2959, 2002.
- BURTON, G.J.; WOODS, A.W.; JAUNIAUX, E.; *et al.* Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow, during Human Pregnancy. *Placenta*, v.30, p.473-482, 2009.
- CALANDRA, T. e ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v.3, p.791-800, 2003.
- CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; *et al.* MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, v. 377, p.68-71, 1995.
- CALIGIURI, M.A. Human natural killer cells. *Blood*, v.112, n.3, p.461-469, 2008.
- CALUWAERTS, S.; VERCRUYSSSE, L.; LUYTEN C.; *et al.* Endovascular Trophoblast Invasion and Associated Structural Changes in Uterine Spiral Arteries of the Pregnant Rat. *Placenta*, v.26, p.574-584, 2005.
- CAMPBELL, D.J. e KOCH, M.A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*, v.11, p.119-130, 2011.
- CAMPBELL, S.; ROWE, J.; JACKSON, C.J.; *et al.* In vitro migration of cytotrophoblast through a decidual endothelial cell monolayer: The role of matrix metalloproteinases. *Placenta*, v.24, p.306-315, 2003.
- CANAVAN, T.P. e SIMHAN, H.N. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *Journal of Reproductive Immunology*, v.74, p.46-52, 2007.
- CARDAROPOLI, S.; PAULESU, L.; ROMAGNOLI, R.; *et al.* Macrophage Migration Inhibitory Factor in Fetoplacental Tissues from Preeclamptic Pregnancies with or without Fetal Growth Restriction. *Clinical and Developmental Immunology*, v.2012, p.1-9, 2012.
- CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, v.7, n.5, p.575-583, 2001.
- CARSON, D.D.; BAGCHI, I.; DEY, S.K.; *et al.* Embryo Implantation. *Developmental Biology*, v.223, p.217-237, 2000.
- CARSON, W.E.; GIRI, J.G.; LINDEMANN, M.J.; *et al.* Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, v.180, p.1395-1403, 1994.
- CARTER A.M. Animal Models of Human Placentation- A Review. *Placenta*, v.28, Supl., p.S41-47, 2007.
- CARTER A.M. e ENDERS A.C. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.46, n.2, p.1-15, 2004.
- CARTER A.M. e MESS A. Evolution of the Placenta in Eutherian Mammals. *Placenta*, v.28, p.259-262, 2007.
- CARTER, A.M.; ENDERS, A.C.; JONES, C.J.P.; *et al.* Comparative Placentation and Animal Models: Patterns of Trophoblast Invasion – A Workshop Report. *Placenta*, v.27, suppl.A, 2006.
- CARTWRIGHT, J. E.; HOLDEN, D. P.; WHITLEY, G. S. J. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, v.128, n.1, p. 181-189, 1999.

- CARVALHO, D.P. Modulation of uterine iodothyronine deiodinases—a critical event for fetal development? *Endocrinology*, v.144, n.10, p.4250-4252, 2003.
- CENCIC, A. e LA BONNARDIÈRE, C. Trophoblastic interferon-gamma current knowledge and possible role(s) in early pig pregnancy. *Veterinary Research*, v.33, p.139-157, 2002.
- CHA, J.; SUN, X.; DEY, S.K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nature Medicine*, v.18, n.12, p.1754-1767, 2012.
- CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R.; TARCA, A. A subset of patients destined to develop spontaneous preterm labor has a abnormal angiogenic/anti-angiogenic profile in maternal plasma: Evidence in support of pathophysiologic heterogeneity of preterm labor derived from a longitudinal study. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, v.22, n.112, p.1122-1139, 2009.
- CHAKRABORTY, D.; KARIM RUMI, M.A.; KONNO, T.; *et al.* Natural Killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 39, p. 16295-16300, 2011.
- CHAKRABORTY, G.; MAGAGNA-POVEDA, A.; PARRATT C.; *et al.* Reduced Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neonatal Rats after Prenatal Exposure to Propylthiouracil (PTH). *Endocrinology*, v.153, n.3, p.1311-1316, 2012.
- CHAN, S.; KACHILELE, S.; HOBBS, E.; *et al.* Placental iodothyronine deiodinase expression in normal and growth-restricted human pregnancies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.88, n.9, p.4488-4495, 2003.
- CHAN, S-Y.; FRANKLYN, J.A.; PEMBERTON, H.N.; *et al.* Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta—the effects of severe intrauterine growth restriction. *Journal of Endocrinology*, v.189, p.465-471, 2006.
- CHAN, S-Y.; VASILOPOULOU, E.; KILBY, M.D.; *et al.* The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. *Nature Reviews Endocrinology*, v.5, p.45-54, 2009.
- CHARNOCK-JONES, D.S. Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *Journal of Anatomy*, v.200, p.607-615, 2002.
- CHARNOCK-JONES, D.S.; CLARK, D.E.; LICENCE, D.; *et al.* Distribution of vascular endothelial growth factor VEGF and its binding sites at the maternal-fetal interface during gestation in pigs. *Reproduction*, v.122, p.753-760, 2001.
- CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. *Placenta*, v.25, p.103-113, 2004.
- CHARNOCK-JONES, D.S.; SHARKEY, A.M.; BOOCOOCK, C.A.; *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biology of Reproduction*, v.51, p.524-530, 1994.
- CHAZARA, O.; XIONG, S.; MOFFETT, A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *Journal of Leukocyte Biology*, v.90, p.703-716, 2011.
- CHEN, W.; HAN, B.-C.; WANG, R.-C.; *et al.* Role of secretory protease inhibitor SPINK3 in mouse uterus during early pregnancy. *Cell Tissue Research*, v.341, p.441-451, 2010.
- CHEN, Z.; ZHANG, J.; HATTA, K.; *et al.* DBA-Lectin Reactivity Defines Mouse Uterine Natural Killer Cell Subsets with Biased Gene Expression. *Biology of Reproduction*, v.87, n.4, p.1-18, 2012.
- CHENG, J.-G. e STEWART, L. Loss of cyclooxygenase-2 retards decidual growth but does not inhibit embryo implantation or development to term. *Biology of Reproduction*, v.68, p.401-404, 2003.

- CHENG, S.Y.; LEONARD, J.L.; DAVIS, P.J. Molecular aspects of thyroid hormone action. *Endocrine Review.*, v.31, n.2, p.139-170, 2010.
- CHIOSSONE, L.; VACCA, P.; ORECCHIA, P.; *et al.* In Vivo Generation Of Decidual Natural Killer Cells From Resident Hematopoietic Progenitors. *Haematologica*, v.99, n.3, p.448-457, 2014.
- CHO, C.-H.; KOH, Y.J.; HAN, J.; *et al.* Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circulatory Research*, v.100, p.e47-e57, 2007.
- 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.
- CHRISTIAN, M.; MAK, I.; WHITE, J.O.; *et al.* Mechanisms of decidualization. *Reproductive BioMedicine*, v.4, Suppl.3, p.24-30, 2001a.
- CHRISTIAN, M.; MARANGOS, P.; MAK, I.; *et al.* Interferon- $\gamma$  Modulates Prolactin and Tissue Factor Expression in Differentiating Human Endometrial Stromal Cells. *Endocrinology*, v.142, n.7, p.3142-3151, 2001b.
- CLARK, D.E.; SMITH, S.K.; HE, Y.; *et al.* A Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Is Produced by the Human Placenta and Released into the Maternal Circulation. *Biology of Reprduction*, v.59, p.1540-1548, 1998.
- CLEMENTI, C.; TRIPURANI, S.K.; LARGE, M.J.; *et al.* Activin-Like Kinase 2 Functions in Peri-implantation Uterine Signaling in Mice and Humans. *PLOS Genetics*, v.9, n.11, p.1-15, 2013.
- CLIFFORD, K.; FLANAGAN, A.M.; REGAN, L. CD56<sup>+</sup> natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Human Reproduction*, v.14, n.11, p.2727-2730, 1999.
- COLICCHIA, M.; CAMPAGNOLO, L.; BALDINI, E.; *et al.* Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Human Reproduction Update*, v.0, n.0, p.1-21, 2014.
- COLLINS, M. K.; TAY, C.; ERLEBACHER, A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal / fetal interface in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v.119, n. 7, 2009.
- COLUCCI, F.; BOULENOUAR, S.; KIECKBUSCH, J.; *et al.* How does variability of immune system genes affect placentation? *Pacenta*, v. 32, p. 539-545, 2011.
- COOPER, J.C.; SHARKEY, A.M.; McLAREN, J.; *et al.* Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor flT in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.105, p.205-213, 1995.
- COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *TRENDS in Immunology*, v.22, n.11, p.633-640, 2001.
- CORREIA-DA-SILVA, G.; BELL, S.C.; PRINGLE, J.H.; *et al.* Patterns of Uterine Cellular Proliferation and Apoptosis in the Implantation Site of the rat During Pregnancy. *Placenta*, v.25, p.538-547, 2004.
- COULAM, C. B. Understanding the immunobiology of pregnancy and applying it to treatment of recurrent pregnancy loss. *Early pregnancy (Online)*, v.4, n.1, p.19-29, 2000.
- CRAVEN, C.M., MORGAN, T.; WARD, K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, v.19, p.241-252, 1998.
- CRAVEN, C.M.; CHEDWICK, L.R.; WARD, K. Placental basal plate formation is associated with fibrin deposition in decidual veins at sites of trophoblast cell invasion. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, p.291-296, 2002.

- CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, v.266, p.1508-1518, 1994.
- CROY, A. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? *Journal of Reproductive Immunology*, v.42, p.127-129, 1999.
- CROY, B. A. e MURPHY, S. P. Maternal-Fetal Immunology. *Immunological Investigation*, v.37, p.389-394, 2008.
- CROY, B.A. e KISO, Y. Granulated metrial gland cells: A natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microscopy Research and Technique*, v.25, n.3, p.189-200, 1993.
- 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, n.1, 2000.
- CROY, B.A.; CHEN, Z.; HOFMANN, A.P.; *et al.* Imaging of Vascular Development in Early Mouse Decidua and Its Association with Leukocytes and Trophoblasts. *Biology of Reproduction*, v.87, n.5, p.1-11, 2012.
- CROY, B.A.; GUMOND, M.J.; LUROSS, J.; *et al.* Uterine Natural killer cells do not require Interleukin-2 for their differentiation or maturation. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.37, p.463-470, 1997.
- CROY, B.A.; HE, H.; ESADEG, S.; *et al.* Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*, v.126, p.149-160, 2003.
- CROY, B.A.; LUROSS, J.A.; GUIMOND, M.J.; *et al.* Uterine natural killer cells: insights into lineage relationships and functions from studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. *Natural Immunity*, v.15, n.1, p.22-33, 1996.
- CROY, B.A.; van den HEUVEL, M.J.; BORZYCHOWSKI, A.M.; *et al.* Uterine natural killer cells: A specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunological Reviews*, v.214, p.161-185, 2007.
- 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, n.4, p.428-465, 2003.
- DAI, D. e OGLE, T.F. Progesterone Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor in Rat Decidua Basalis during Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.61, p.326-332, 1999.
- DANIEL, G.B. e NEELIS, D.A. Thyroid Scintigraphy in Veterinary Medicine. *Seminars in Nuclear Medicine*, v.44, p.24-34, 2014.
- DARRAS, V.M.; HOUBRECHTS, A.M.; VAN HERCK, S.L.J. Intracellular TH metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1849, p.130-141, 2015.
- DENGE, W.-B.; LIANG, X.-H.; LIU, J.-L.; *et al.* Regulation and function of deiodinases during decidualization in female mice. *Endocrinology*, v.155, p.2704-2717, 2014.
- DENTICE, M.; MARSILI, A.; ZAVACKI, AM.; *et al.* The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1830, p.3937-3945, 2013.
- DEY, S.K.; LIM, H.; DAS, S.K.; *et al.* Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews*, v.25, n.3, p.341-373.
- DILWORTH, M.R. e SILBLEY, C.P. Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta*, v.27, p.S34-S39, 2013.
- DIMITRIADIS, E.; WHITE, C.A.; JONES, R.L.; *et al.* Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Human Reproduction Update*, v.11, n.6, p.613-630, 2005.
- DISANTO, J.P.; GUY-GRAND, D.; FISHER, A.; *et al.* Critical role for the common cytokine receptor  $\gamma$  chain in intrathymic and peripheral T cell selection. *Journal of Experimental Medicine*, v.183, p.1111-1118, 1996.
- DONG, Y.-L.; FANG, L.; GANGULA, P.R.R.; *et al.* Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Messenger Ribonucleic Acid Expression in Pregnant Rat Uterus. *Biology of Reproduction*, v.59, p.933-940, 1998.

- DONG, Y.-L.; GANGULA, P.R.R.; YALLAMPALLI, C. Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.107, p.249-254, 1996.
- DOUGLAS, N.C.; TANG, H.; GOMEZ, R.; PYTOWSKI, B.; *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) functions to promote uterine decidual angiogenesis during early pregnancy in the mouse. *Endocrinology*, v.150, p.3845-3854, 2009.
- DOUGLAS, N.C.; ZIMMERMANN, R.C.; TAN, Q.K.; *et al.* VEGFR-1 blockade disrupts peri-implantation decidual angiogenesis and macrophage recruitment. *Vascular Cell*, v.6, p.1-11, 2014.
- DUAN, B. e MOREL, L. Role of B-1a cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v.5, p.403-408, 2006.
- DUARTE-GUTERMAN, P.; NAVARRO-MARTIN, L.; TRUDEAU, V.L. Mechanisms of crosstalk between endocrine systems: Regulation of sex steroid hormone synthesis and action by thyroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, v.203, p.69-85, 2014.
- DUNK, C.; SHAMS, M.; NIJJAR, S.; *et al.* Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Activate Trophoblast Tie-2 to Promote Growth and Migration during Placental Development. *The American Journal of Pathology*, v.156, n.6, p.2185-2199, 2000.
- DUNK, C.; SMITH, S.; HAZAN, A.; *et al.* Promotion of angiogenesis by human endometrial lymphocytes. *Immunological investigation*, v.37, p.583-610, 2008.
- ENDERS, A.C. e BLANKENSHIP, T.N. Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.38, p3-15, 1999.
- ENGELHARDT, H.; CROY, B.A.; KING, G.J. Evaluation of Natural Killer Cell Recruitment to Embryonic Attachment Sites During Early Porcine Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1185-1192, 2002.
- ENGELHARDT, H.; CROY, B.A.; KING, G.J.; Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.52, p.115-131, 1997.
- ERLEBACHER, A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annual Review of Immunology*, v.31, p.387-411, 2013a.
- ERLEBACHER, A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nature Reviews Immunology*, v.11, p.23-33, 2013b.
- EVANS, C.A. e KENNEDY, T.G. The importance of prostaglandin synthesis for the initiation of blastocyst implantation in the hamster. *Journal of Reproduction, and Fertility*, v.54, p.255-261, 1978.
- EVANS, R. Effect of X-irradiation on host-cell infiltration and growth of a murine fibrosarcoma. *British Journal of Cancer*, v.35, p.557-566, 1977.
- FAAS, M.M. e deVOS, P. Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats. *Journal of Reproductive Immunology*, v.119, p.91-97, 2017.
- FARIA, M.R.; HOSHIDA, M.S.; FERRO, E.A.; *et al.* Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.8, n. 1, p.95, 2010.
- FAVARON, P.O.; MESS, A.M.; OLIVEIRA, M.F.; *et al.* Morphometric analysis of the placenta in the New World mouse *Necromys lasiurus* (Rodentia, Cricetidae): a comparison of placental development in cricetids and murids. *Reproductive Biology and Endocrinology*, p.11:10, 2013.
- FAZLEABAS, A.T.; KIM, J.J.; STRAKOVA, Z. Implantation: Embryonic Signals and the Modulation of the Uterine Environment- a review. *Placenta*, v.18, suppl.A, S26-S31, 2004.
- FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews*, v.25, n.4, p.581-611, 2004.

FERRARI, A.; PETRAGLIA, F.; GURPIDE, E. Corticotropin releasing factor decidualizes human endometrial stromal cells in vitro. Interaction with progesterin. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.54, n5/6, p.251-255, 1995.

FEST, S.; ALDO, P.B.; ABRAHAMS, V.M.; *et al.* Trophoblast-Macrophage interaction: a regulatory network for protection of pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.57, p.55-66, 2007.

FILANT, J. e SPENCER, T.E. Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*, v.88, n.4, 93, p.1-9, 2013.

FILANT, J. e SPENCER, T.E. Uterine Glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity and decidualization. *The International Journal of Developmental Biology*, v.58, p.107-116, 2014.

FINN, C.A. e BREDEL, J.C.S. Autoradiographic study of the effect of actinomycin D on decidual differentiation of stromal cells in the mouse uterus. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.50, p.109-111, 1977.

FINN, C.A. e HINCHLIFFE, J.R. Histological and histochemical analysis of the formation of implantation chambers in the mouse uterus. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.9, p.301-309, 1965.

FINN, C.A. e HINCHLIFFE, J.R. Histological and histochemical analysis of the formation of implantation chambers in the mouse uterus. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.9, p.301-309, 1965.

FINN, C.A.; POPE, M.D.; MILLIGAN, S.R. A study of the early morphological changes initiated in the uterine luminal epithelium by substances (oil and carrageenan) which induce the decidual cell reaction in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.86, p.619-626, 1989.

FISHER, D.A. The hypothyroxinemia of prematurity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.82, n.6, 1997.

FLAMANT, F. e GAUTHIER, K. Thyroid hormone receptors: The challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1830, p.3900-3907, 2013.

FLOOD, D.E.K.; FERNANDINHO, J.I.; LANGLOIS, V.S. Thyroid hormones in male reproductive development Evidence for direct crosstalk between the androgen and thyroid hormone axes. *General and Comparative Endocrinology*, v.192, p.2-14, 2013.

FONTANA, V.; COLL, T.A.; SOBARZO, C.M.A.; *et al.* Matrix metalloproteinase expression. And activity in trophoblast decidual tissue at organogenesis in CF-1 mouse. *Journal of Molecular Histology*, v.43, p.487-496, 2012.

FONTANA, V.A.; SANCHEZ, M.; CEBRAL, E.; *et al.* Interferon- $\gamma$  inhibits metalloproteinase activity and cytotrophoblast cell migration. *Journal of Reproductive Immunology*, v.64, p.20-26, 2010.

FORHEAD, A.J. e FOWDEN, A.L. Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. *Journal of Endocrinology*, v.221, R87-R103, 2014.

FRANCO, H.L.; DAI, D.; LEE, K.Y.; *et al.* WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *The FASEB Journal*, v.25, p.1176-1187, 2011.

FREDERIKSEN, M.C. Physiologic Changes in Pregnancy and Their Effect on Drug Disposition. *Seminars in Perinatology*, v.25, n.3, p.120-123, 2001.

FREITAS, E.S.; LEITE, E.D.; SOUZA, C.A.; *et al.* Histomorphometry and Expressions of Cdc47 and Caspase-3 in Hyperthyroid Rats Uteri and Placentas during Gestation and Postpartum Associated with Fetal Development. *Reproduction, Fertility, and Development*, v.19, p.498-509, 2007.

FU, B.; LI, X.; SUN, R.; *et al.* Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory T<sub>H</sub>17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.E231-E240, 2013.

FUMUSO, E. A. *et al.* Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis : Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.118, p.30-39, 2007.



- FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, v. 27, p.11-18, 2014.
- GAGIOTI, S.; SCAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the Mouse Implanting Trophoblast in Nitric Oxide Production During Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.62, p.260-268, 2000.
- GALTON, V.A. The roles of the iodothyronine deiodinases in mammalian development. *Thyroid*, v.15, n.9, p.823-834, 2005.
- GALTON, V.A.; MARTINEZ, E.; HERNANDEZ, A.; *et al.* Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. *The Journal of Clinical Investigation*, v.103, p.979-987, 1999.
- 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, p.2123-2128, 2001.
- GAO, Y.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Thyroid hormone function in the rat testis. *Frontiers in Endocrinology*, v.5, art.88, p.1-7, 2014.
- GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; *et al.* Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*, v.5, p.656-661, 2010.
- GELLERSEN, B. e BROSENS, J.J. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. *Endocrine Reviews*, v.35, n.6, p. 851-905, 2014.
- GELLERSEN, B.; BROSENS, I.A.; BROSENS, J.J. Decidualization of the Human Endometrium: Mechanisms, Functions, and Clinical Perspectives. *Seminars in Reproductive Medicine*, v.25, n.6, p.445–453, 2007.
- GENBACEV, O.; JOSLIN, R.; DAMSKY, C.H.; *et al.* Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *The Journal of Clinical Investigation*, v.97, n.2, p.540-550, 1996.
- GENBACEV, O.D.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.A.; *et al.* Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface. *Science*, v.299, p.405-408, 2003.
- GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A.C.; BURTON, G.J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta*, v.23, p.3-19, 2002.
- GEORGIADES, P.; FERGUSON-SMITH, A.C.; BURTON, G.J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta*, v.23, p.3-19, 2002.
- GEREBEN, B.; ZAVACKI, A.M.; RIBICH, S.; *et al.* Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Review*, v.29, n.7, p.898-938, 2008.
- GERMAIN, D.L.St.; GALTON, V.A.; HERNANDEZ, A. Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*, v.150, p.1097-1107, 2009.
- GEVA, E.; GINZINGER, D.G.; ZALOUDEK, C.J.; *et al.* Human placental vascular development\_vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.87, n.9, p.4213-4224, 2002.
- GIBBONS, G.H e DZAU, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. *The New England Journal of Medicine*, v.330, n.20, p.1431-1438, 1994.
- GINHOUX, F.; LIU, K.; HELFT, J.; *et al.* The origin and development of nonlymphoid tissue CD103<sup>+</sup> DCs. *Journal of Experimental Medicine*, v.206, n.13, p.3115-3130, 2009.
- GOLDMAN-WOHL, D. e YAGEL, S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to preeclampsia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.187, p.233-238, 2002.

- GRAHAM, P.A.; REFSAL, K.R.; NACHREINER, R.F. Etiopathologic Findings of Canine Hypothyroidism. *Veterinary Clinics of Small Animal*, v.37, p.617-631, 2007.
- GRAY, C.A.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; *et al.* Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction*, v.124, p.289-300, 2002.
- GREENWOOD, J.D.; MINHAS, K.; DI SANTO, J.P.; *et al.* Ultrastructural Studies of Implantation Sites from Mice Deficient in Uterine Natural Killer Cells. *Placenta*, v.21, p.693-702, 2000.
- GREISS, F.C.JR.; ANDERSON, S.G.; STIL, J.G. Uterine pressure-flow relationships during early gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.126, n.7, p.799-808, 1976.
- GU, Y.; JOW, G.M.; MOULTON, B.C.; *et al.* Apoptosis in Decidual Tissue Regression and Reorganization. *Endocrinology*, v.135, n.3, p.1272-1279, 1994a.
- GU, Y.; SOARES, M.J.; SRIVASTAVA, R.K.; *et al.* Expression of Decidual Prolactin-Regulated Protein in the Rat Decidua. *Endocrinology*, v.135, n.4, p.1422-1427, 1994b.
- GU, Y.; SRIVASTAVA, R.K.; CLARKE, D.L.; *et al.* The decidual prolactin receptor and its regulation by decidua derived factors. *Endocrinology*, v.137, p.4878-4885, 1996.
- GUILLOMOT, M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. *Placenta*, v.20, p.339-345, 1999.
- GUILLOMOT, M.; FLÉCHON, J.E.; LEROY, E. *Blastocyst development and implantation*. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. *Reproduction in Mammals and Man*. Paris, cap.20, p.387-412, 1993.
- 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.169-179, 1997.
- GUIMOND, M.J.; WANG, B.; CROY, B.A. Engraftment of Bone Marrow from Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice Reverses the Reproductive Deficits in Natural Killer Cell-deficient tgE26 Mice. *Journal of Experimental Medicine*, v.187, n.2, p.217-223, 1998.
- GUSTAFSSON, C.; HUMMERDAL, P.; MATTHIESEN, L.; *et al.* Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of Reproductive Immunology*, v.71, p.41-56, 2006.
- GUSTAFSSON, C.; MJÖSBORG, J.; MATUSSEK, A.; *et al.* Gene Expression Profiling of Human Decidual Macrophages: Evidence for Immunosuppressive Phenotype. *Plos ONE*, v.3, n.4, e2078, p.1-9, 2008.
- HAIMOVICI, F.; HILL, J.A.; ANDERSON, D.J. The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biology of Reproduction*, v.44, p.69-75, 1991.
- HALES, C.N. e BARKER, D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v.35, p.595-601, 1992.
- HAMILTON, S.; OOMOMIAN, Y.; STEPHEN, G.; *et al.* Macrophages Infiltrate the Human and Rat Decidua During Term and Preterm Labor: Evidence That Decidual Inflammation Precede Labor. *Biology of Reproduction*, v.86, n.2, 39, 1-9, 2012.
- HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*, v.12, n.9, p.1065-1074, 2006.
- HANNA, J.; WALD, O.; GOLDMAN-WOHL, D.; *et al.* CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16<sup>-</sup> human natural killer cells. *Blood*, v.102, p.1569-1577, 2003.
- HAPON, M.B.; SIMONCINI, M.; VIA, G.; *et al.* Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction*, v.126, p.371-382, 2003.

- HARRIS, L.K. e APLIN, J.D. Vascular Remodeling and Extracellular Matrix Breakdown in the Uterine Spiral Arteries During Pregnancy. *Reproduction Science*, v.14, n.8S, p.28-34, 2007.
- HARRIS, L.K. Review Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy How to Remodel a Vessel. *Placenta*, v.24, p.S93-S98, 2010.
- HAZAN, A.D.; SMITH, S.D.; JONES, R.L.; *et al.* Mechanisms of Human Decidual Spiral Artery Remodeling in Vitro. *The American Journal of Pathology*, v.177, n.2, p.1017-1030, 2010.
- HEAD, J.R. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. *Natural Immunity*, v.15, n.1, p.7-21, 1996.
- HEIJLEN, M.; HOUBRECHTS, A.M.; DARRAS, V.M. Zebrafish as a model to study peripheral thyroid hormone metabolism in vertebrate development. *General and Comparative Endocrinology*, v.188, p.289-295, 2013.
- HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; KOMI, J.; Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, v.131, p.498-505, 2003.
- HENDERSON, T.A.; SAUNDERS, P.T.K.; MOFFETT-KING, A.; *et al.* Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.88,n.1, p.440-449, 2003.
- HENNEMANN, G. Autonomously Functioning Thyroid Nodules and Other Causes of Thyrotoxicosis. In: Guyton and Hall- Textbook of medical physiology, 11th Edit., J.E. Hall, Guyton and Hall- Textbook of medical physiology, Elsevier Saunders, Philadelphia, 102:2043-2050, 2006.
- HERINGTON, J.L. e BANY, B.M. Effect of the Conceptus on Uterine Natural Killer Cell Numbers and Function in the Mouse Uterus During Decidualization. *Biology of Reproduction*, v.76, p. 579-588, 2007.
- HERINGTON, J.L.; UNDERWOOD, T.; McCONAHA, M.; *et al.* Paracrine Signals from the Mouse Conceptus Are Not Required for the Normal Progression of Decidualization. *Endocrinology*, v.150, n.9, p.4404-4413, 2009.
- HERNANDEZ, A. Structure and Function of the Type 3 Deiodinase Gene. *Thyroid*, v.15, n.8, p.865-874, 2005.
- HESS, A.P.; HAMILTON, A.E.; TALBI, S.; *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: Amplification of immune and angiogenic modulators. *Biology of Reproduction*, v.76, p.102-117, 2007.
- HEWITT, S.C.; DEROO, B.J.; HANSEN, K.; *et al.* Estrogen Receptor-Dependent Genomic Responses in the Uterus Mirror the Biphasic Physiological Response to Estrogen. *Molecular Endocrinology*, v.17, n.10, p.2070-2083, 2003.
- HOFMANN, G.E.; GLATSTEIN, I.; SCHTZ, F.; *et al.* Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, v.170, p.671-676, 1994.
- HOGAN, B.L.M. Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics and Development*, v.6, p.432-438, 1996.
- HOLSBERGER, D.R.; JIRAWATNOITAI, S.; KIYOKWA, H.; *et al.* Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27<sup>kip1</sup> in postnatal murine Sertoli cell. *Endocrinology*, v.144, n.9, p.3732-3738, 2003.
- HOLT, W.V.; FAZELI, A. The Oviduct as a Complex Mediator of Mammalian Sperm Function and Selection. *Molecular Reproduction and Development*, v.77, p.934-943, 2010.
- HOM, Y.K.; YOUNG, P.; WIESEN, J.F.; *et al.* Uterine and Vaginal Organ Growth Requires Epidermal Growth Factor Receptor Signaling from Stroma. *Endocrinology*, v.139, p.913-921, 1998.
- HOSHIDA, M.S.; GORJÃO, R.; LIMA, C.; *et al.* Regulation of gene Expression in Mouse Trophoblast Cells by Interferon-gamma. *Placenta*, v.28, p.1059-1072, 2007.
- HOUCK, K.A.; FERRARA, N.; WINER, J.; *et al.* The vascular endothelial growth factor family identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology*, v.5, n.12, 1991.

- HOUSER, B.L.; TILBURGS, T.; HILL, J.; *et al.* Two Unique Human Decidual Macrophage Populations. *The Journal of Immunology*, v.186, p.2633-2642, 2011.
- HU, D. e CROSS, J.C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *The International Journal of Developmental Biology*, v.54, p.341-354, 2010.
- HUANG, S.A.; DORFMAN, D.M.; GENEST, D.R.; *et al.* Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.88, n.3, p.1384-1388, 2003.
- HUANG, S.J.; CHEN, C.P.; SCHATZ, F.; *et al.* Pre- eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *Journal of Pathology*, v.214, p.328-336, 2008.
- HUPPERTZ, B. e PEETERS, L.L.H. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis*, v.8, p.157-167, 2005.
- HUPPERTZ, B.; KERTSCHANSKA, S.; DEMIR, A.Y.; *et al.* Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Reserach*, v.291, p.133-148, 1998.
- IMAKAWA, K.; CHANG, K.T.; CHRISTENSON, R.K. Pre-Implantation Conceptus and Maternal Uterine Communications: Molecular Events Leading to Successful Implantation. *Journal of Reproduction and Development*, v.50, n.2, p.155-169, 2004.
- IRVING, J.A. e LALA, P.K. Functional Role of Cell Surface Integrins on Human Trophoblast Cell Migration: Regulation By TGF- $\beta$ , IGF-II, and IGFBP-1. *Experimental Cell Research*, v. 217, p. 419-427, 1995.
- JACKSON, D.; VOLPERT, O.V.; BOUCK, N.; *et al.* Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science*, v.66, p.1581-1584, 1994.
- JAHNKE, G.D.; CHOKSI, N.Y.; MOORE, J.A.; *et al.* Thyroid Toxicants: Assessing Reproductive Health Effects. *Environ. Health Perspect*, v.112, n.3, p.363-368, 2004.
- JAMES, J.L.; CARTWRIGHT, J.E.; WHITLEY, G.S.; *et al.* The regulation of trophoblast migration across endothelial cells by low shear stress: consequences for vascular remodeling in pregnancy. *Cardiovascular Research*, v.93, p.152-161, 2012.
- JAMES, S.R.; FRANKLYN , J.A.; KILBY, M.D. Placental transport of thyroid hormone. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.21, n.2, p.253-264, 2007.
- JAUNIAUX, E.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; *et al.*, Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. *American Journal of Pathology*, v.157, n.6, p.2111-2122, 2000.
- JENSEN, F.; WALLUKAT, G.; HERSE, F.; *et al.* CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> Cells as Indicators of Preeclampsia. *Hypertension*, v. 59, p.861-868, 2012.
- JEONG, J.W.; DWAK, I.; LEE, K.Y.; *et al.* Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility. *Biology of Reproduction*, v.83, p.396-403, 2010.
- 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.
- KALLIKOURDIS, M.; ANDERSEN, K.G.; WELCH, K.A.; *et al.* Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5<sup>+</sup> 'effector'regulatory T cells in the gravid uterus. *PNAS*, v.104, n.2, p.594-599, 2007.
- KAM, E.P.HY.; GARDNER, L.; LOKE, Y.W.; *et al.* The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Human Reproduction*, v.14, n.8, p.2131-2138, 1999.
- KÄMMERER, U.; EGGERT, A.O.; KAPP, M.; *et al.* Unique Appearance of Proliferating Antigen-Presenting Cells Expressing DC-SIGN (CD209) in the Decidua of Early Human Pregnancy. *American Journal of Pathology*, v.162,

n.3, p.887-896- 2003.

KAMMERER, U.; SCHOPPET, M.; MeLELLAN, A.D.; *et al.* Human decidua contains potent immunostimulatory CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *American Journal of Pathology*, v.157, n.1, p.159-169, 2000.

KANTOR, A.B.; STALL, A.M.; ADAMS, S.; *et al.* Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Immunology*, v.89, p.3320-3324, 1992.

KAPITEIJN, K.; KOOLWIJK, P.; VAN DER WEIDEN, R.M.F.; *et al.* Human embryo-conditioned medium stimulates in vitro endometrial angiogenesis. *Fertility and Sterility*, v.85, suppl.1, p.232-239, 2006.

KARPOVICH, N.; CHOBOTOVA, K.; CARVER, J.; *et al.* Expression and function of interleukin- 11 and its receptor  $\alpha$  in the human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, v.9, n.2, p.75-80, 2003.

KARTEN, C.M.; BEHREND, J.; WAGNER, A.K.; *et al.* DC within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *European Journal of Immunology*, v.39, p.2203-2214, 2009.

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. e DOKTORCIK, P.E. Uterine decidualization in hypohysectomized-ovariectomized rats: effects of pituitary hormones. *Biology of Reproduction*, v.39, p.318-328, 1988.

KENNEDY, T.G. e ZAMECNIK, J. The concentration of 6-keto-prostaglandin F1 $\alpha$  is markedly elevated at the site of blastocyst implantation in the rat. *Prostaglandins*, v.16, n.4, p.599-605, 1978.

KENNEDY, T.G.; GILLIO-MEINA, C.; PHANG, S.H. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*, v.134, p.635-643, 2007.

KESKIN, D. B.; ALLAN, D. S. J.; RYBALOV, B.; *et al.* TGF  $\beta$  promotes conversion of CD16<sup>+</sup> peripheral blood NK cells into CD16<sup>-</sup> NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.104, n.9, p.3378-3383, 2007.

KESTER, M.H.A.; KUIPER, G.G.J.M.; VERSTEEG, R.; *et al.* Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology*, v.147, n.2, p.5845-5854, 2006.

KHALIQ, A.; LI, X.F.; SHAMS, M.; *et al.* Localisation of Placenta Growth Factor PIGF in Human Term Placenta. *Growth Factor*, v.13, n.3-4, p.243-250, 1996.

KILBY, M. D.; BARBER, K.; HOBBS, E.; *et al.* Thyroid Hormone Action in the Placenta. *Placenta*, v.26, p.106-113, 2005.

KILBY, M.D.; VERHAEG, J.; GITTOES, N.; *et al.* Circulating Thyroid Hormone Concentrations and Placental Thyroid Hormone Receptor Expression in Normal Human Pregnancy and Pregnancy Complicated by Intrauterine Growth Restriction (IUGR). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.83, n.8, p.2964-2971, 1998.

KIM, C.J.; ROMERO, R.; KUSANOVIC, J.P.; *et al.* The frequency, clinical significance and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Modern Pathology*, v.23, p.1000-1011, 2010.

KIM, J.J. e FAZLEABAS, A.T. Uterine receptivity and implantation: the regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-I (IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-I (FOXO-I) in the baboon, endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.34, n.2, p.1-6, 2004.

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.

- KIM, J.J.; TAYLOR, H.S.; AKBAS, G.E.; *et al.* Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity by FKHR and HOXA10 in primate endometrial cells. *Biology of Reproduction*, v.68, p.24-30, 2003.
- KIM, M.; PARK, H.J.; SEOL, J.W.; *et al.* VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodeling during pregnancy. *EMBO Molecular Medicine*, v.5, p.1415-1430, 2013.
- KIM, S.; LEE, D.S.; WATANABE, K.; *et al.* Interferon- $\gamma$  promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiology*, v.5, n.22, p.1-11, 2005a.
- KIM, Y.M.; ROMERO, R.; OH, Y.; *et al.* Toll-like receptor 4: A potential link between “danger signals,” the innate immune system, and preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.193, p.921.e1-921.e8, 2005b.
- KINGDOM, J.C.P. e KAUFMANN, P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*, v.18, p.613-621, 1997.
- KISO, Y.; POLLARD, J.W.; CROY, B.A. A study of granulated metrial gland cell differentiation in pregnant, macrophage-deficient, osteopetrotic (op/op) mice. *Experientia*, v.48, p.973-975, 1992.
- KITAYA, K.; NAKAYAMA, T.; OKUBO, T.; *et al.* Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$  in Human Endometrium: Its Role in Endometrial Recruitment of Natural Killer Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.88, n.4, p.1809-1814, 2003a.
- KITAYA, K.; YASUDA, J.; NAKAYAMA, T.; *et al.* Effect of female sex steroids on human endometrial CD16 neg CD56 bright natural killer cells. *Fertility and Sterility*, v.79, Suppl.1, p. 730–734, 2003b.
- KITAYA, K.; YASUDA, J.; YAGI, I.; *et al.* IL-15 Expression at Human Endometrium and Decidua. *Biology of Reproduction*, v.63, p.683-687, 2000.
- KLEIN, R.Z.; CARLTON, E.L.; FAIX, J.D.; *et al.* Thyroid function in very low birthweight infants. *Clinical Endocrinology*, v.47, p.411-417, 1997.
- KLEINFELD, R.G.; MORROW, H.A.; DeFEO, V.J. Intercellular junctions between decidual cells in the growing deciduoma of the pseudopregnant rat uterus. *Biology of Reproduction*, v.15, p.593-603, 1976.
- KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *The International Journal of Developmental Biology*, v.54, n.2-3, p.269-280, 2010.
- KOGA, K e MOR, G. Toll-Like Receptors at the Maternal–Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, n.6, p.587-600, 2010.
- KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. *Journal Obstetric and Gynaecology Research*, v.35, n.2, p.191–202, 2009.
- KOGA, K.; OSUGA, Y.; YOSHINO, O.; *et al.* Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.88, n.5, p.2348-2351, 2003.
- KOOPDONK-KOOL, J.M.; VIILDER, J.J.; VEENBOER, G.J.; *et al.* Type II and type III deiodinase activity in human placenta as a function of gestational age. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.81, n.6, 1996.
- KOOPMAN, L. A.; KOPCOW, H.D.; RYBALOV, B.; *et al.* Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *The Journal of experimental medicine*, v.198, n.8, p.1201–12, 2003.
- KOPCOW, H.D. e KARUMANCHI, S.A. Angiogenic Factors and Natural Killer (NK) Cells in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, v.76, n.1-2, p.23-29, 2007.
- KRAMER, B.W.; KAEMMERER, U.; KAPP, M.; *et al.* Decreased expression of angiogenic factors in placentas with chorioamnionitis after preterm birth. *Pediatric Research*, v.58, p.607-612, 2005.
- KRASSAS, G.E. Thyroid disease and female reproduction. *Fertility and Sterility*, v.74, n.6, p.1063-1070, 2000.

- KRASSAS, G.E.; POPPE, K.; GLLNOER, D. Thyroid Function and Human Reproductive Health. *Endocrine Reviews*, v.31, n.5, p.702-755, 2010.
- KREY, G.; FRANK, P.; SHAIKLY, V.; *et al.* In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency affecting implantation and early placental development in mice. *Journal of Molecular Medicine*, v.86, p.999-1011, 2008.
- KRUSE, A.; MARTENS, N.; FERNEKORN, U.; *et al.* Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.66, p.333-345, 2002.
- KRÜSSEL, J.S.; BIELFELD, P.; POLAN, M.L.; *et al.* Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v.110, p.S2-S9, 2003.
- LALA, P.K. e CHACRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*, v.24, p.575-587, 2003.
- LaMARCA, B.; WALLACE, K.; HERSE, F.; *et al.* Hypertension in Response to Placental Ischemia During Pregnancy Role of B Lymphocytes. *Hypertension*, v.57, p.865-871, 2011.
- LANE, B.; OXBERRY, W.; MAZELLA, J.; *et al.* Decidualization of human endometrial stromal cells in vitro: effects of progestin and relaxin on the ultrastructure and production of decidual secretory proteins. *Human Reproduction*, v.9, n.2, p.259-266, 1994.
- LARGE, M.J. e DeMAYO, F.J. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.358, p.155-165, 2012.
- LASH, G.E.; ROBSON, S.C.; BULMER, J.N. Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta*, v. 24, S87-S92, 2010.
- LASH, G.E.; SCHIESSL, B.; KIRKLEY, M.; *et al.* Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*, v.80, p.572-580, 2006.
- LASKARIN, G.; CUPURDIJA, K.; SOTOSEK, V.; The presence of functional mannose receptor on macrophages at the maternal–fetal interface. *Human Reproduction*, v.29, n.4, p.1057-1066, 2005.
- LAWS, M.J.; TAYLOR, R.N.; SIDELL, N.; *et al.* Gap junction communication between uterine stromal cells plays a critical role in pregnancy-associated neovascularization and embryo survival. *Development and Disease*, v.135, p.2659-2668, 2008.
- LEANZA, E.C.; HOSHIDA, M.S.; COSTA, A.F.; *et al.* Signaling molecules involved in IFN-gamma-inducible nitric oxide synthase expression in the mouse trophoblast. *American journal of reproductive immunology*, v.58, n.6, p.537–546, 2007.
- LeBIEN, T.W. e TEDDER, T.F. B lymphocytes how they develop and function. *Blood*, v.112, p.1570-1580, 2008.
- LEDFORD, B.E.; RANKIN, J.C.; MARKWALD, R.R.; *et al.* Biochemical and morphological changes following artificially stimulated decidualization in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*, v.15, p.529-535, 1976.
- LEE, K.Y. e DeMAYO, F.J. Focus on Implantation Animal models of implantation. *Reproduction*, v.128, p.679-695, 2004.
- LEE, K.Y.; HEONG, J.W.; TSAI, S.Y.; *et al.* Mouse models of implantation. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.18 No.6, p. 234-239, 2007.
- LEE, S.K.; KIM, J.Y.; LEE, M.; *et al.* Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.67, p.311-318, 2012.
- LENO-DURÁN, E.; HATTA, K.; BIANCO, J.; *et al.* Fetal–placental hypoxia does not result from failure of spiral arterial modification in mice. *Placenta*, v.31, p.731-737, 2010.
- 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.

- LEWIS, R.M.; GLAZIER, J.; GREENWOOD, S.L.; *et al.* L-serine uptake by human placental microvillous membrane vesicles. *Placenta*, v.28, p.445-452, 2007.
- LI, H.; GU, B.; ZHANG, Y.; *et al.* Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta*, v.26, p.210-217, 2005.
- LI, H.-Y.; CHANG, S.-P.; YUAN, C.-C.; *et al.* Nitric oxide induces extensive apoptosis in endometrial epithelial cells in the presence of progesterone: Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways. *Molecular Human Reproduction*, v.7, n.8, p.755-763, 2001.
- LI, Q.; KANNAN, A.; WANG, W.; *et al.* Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. *The Journal of Biological Chemistry*, v.282, n.43, p.31725-31732, 2007.
- LIAO, Q.-P.; BUHIMSCHI, I.A.; SAADE, G.; *et al.* Regulation of vascular adaptation during pregnancy and postpartum: Effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Human Reproduction*, v.11, n.12, p.2777-2784, 1996.
- LIDSTRÖM, C.; MATTHIENSEN, L.; BERG, G.; *et al.* Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.50, p.444-452, 2003.
- LIM, H.; PARLA, B.C.; DAS, S.K.; *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, v.91, p.197-208, 1997.
- LIN, H.; MOSMANN, T.R.; GUILBERT, L.; *et al.* Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *The Journal of Immunology*, v.151, n.9, p.4562-4573, 1993.
- LIN, H.-Y.; THACORE, H.R.; DAVIS, F.B.; *et al.* Thyroid hormone analogues potentiate the antiviral action of interferon- $\gamma$  by two mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, v.167, p.269-276, 1996.
- LIN, H.-Y.; YEN, P.M.; DAVIS, F.B.; *et al.* Protein synthesis-dependent potentiation by thyroxine of antiviral activity of interferon- $\gamma$ . *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v.273, n.4, p.C1225-C1232, 1997.
- LINDHARD, A.; BENTIN-LEY, U.; RAVN, V.; *et al.* Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *Fertility and Sterility*, v.78, n.2, p.221-233, 2002.
- LIU, K. e NUSSENZWEIG, M.C. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*, v.234, p.45-54, 2010.
- LIU, K.; VICTORA, G.D.; SCHWICKERT, T.A.; *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science*, v.324, p.392-397, 2009.
- LOCKWOOD, C.J.; MATTA, P.; KRIKUN, G.; *et al.* Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  in First Trimester Human Decidual Cells. *American Journal of Pathology*, v.168, n.2, p.445-452, 2006.
- LOUBIÈRE, L.S.; VASILOPOULOU, E.; BULMER, J.N.; *et al.* Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta*, v.31, p.295-304, 2010.
- LUBAHN, D.B.; MOY, J.S.; GOLDING, T.S.; *et al.* Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Genetics*, v.90, p.11162-11166, 1993.
- LUO, J.; QIAO, F.; YIN, X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and Their Invasiveness in a Cocultured Model. *Journal of Reproduction and Development*, v.57, n.1, p.84-91, 2011.
- LUTTUN, A.; TJWA, M.; MOONS, L.; *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt 1. *Nature Medicine*, v.8, n.8, p.831-840, 2002.



- LYALL, F. Priming and Remodelling of Human placental bed spiral arteries during pregnancy. *Placenta*, v.26, suppl.A, p.S31-S36, 2005.
- LYDON, J.P.; DeMAYO, F.J.; FUNK, C.R.; *et al.* Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development*, v.9, p.2266-2278, 1995.
- MACCANI, M.A. e MARSIT, C.J. Epigenetics in the Placenta. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.62, p.78-89, 2009.
- MADEJA, Z.; YADI, H.; APPS, R.; *et al.* Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proceedings of the National Academy Sciences*, v.108, n.10, p.4012-4017, 2011.
- MAGLIONE, D.; GUERRIERO, V.; VIGLIETTO, G.; *et al.* Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Biochemistry*, v.88, p.9267-9271, 1991.
- MAISONPIERRE, P.C.; SURI, C.; JONES, P.F.; *et al.* Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie-2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science*, v.277, p.55-60, 1997.
- MAKRIGIANNAKIS, A.; KARAMOUTIL, M.; DRAKAKIS, P.; *et al.* Fetomaternal immunotolerance. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.60, p.482-496, 2008.
- MALASSINE, A.; FRENDO, J.L.; EVAÏN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update*, v.9, n.6, p.531-539, 2003.
- MALLIDI, T.V.; CRAIG, L.E.; SCHLOEMANN, S.R.; *et al.* Murine endometrial and decidual NK1.1<sup>+</sup> natural killer cells display a B220<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cell surface phenotype. *Biology of Reproduction*, v.81, p.310-318, 2009.
- MANASTER, I. e MANDELBOIM, O. The Unique Properties of Uterine NK Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* ., v.63, p.434-444, 2010.
- 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, n.4A, p.609-614, 2002.
- MARUO, T.; MATSUO, H.; MOCHIZUKI, M. Thyroid hormone as a biological amplifier of differentiated trophoblast function in early pregnancy. *Acta Endocrinologica*, p.12558-12566, 1991.
- MARUO, T.; MATSUO, H.; OTANI, T.; *et al.* Role of epidermal growth factor EGF and its receptor in the development of the human placenta. *Reproduction, Fertility, and Development*., v.7, n.6, p.1465-1470, 1995.
- MASSMANN, G.A.; ZHANG, J.; FIGUEROA, J.P. Functional and molecular characterization of nitric oxide synthase in the endometrium and myometrium of pregnant sheep during the last third of gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.181, p.116-125, 1999.
- MATJILA, M.; MILLAR, R.; VAN DER SPUY, Z.; *et al.* The differential expression of Kiss1, MMP9 and angiogenic regulators across the feto-maternal interface of healthy human pregnancies: Implications for trophoblast invasion and vessel development. *PLOS ONE*, v.8, n.5, e63574, p.1-13, 2013.
- McGARRY, M.P. e STEWART, C.C. Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80. *Journal of Leukocyte Biology*, v.50, p.471-476, 1991.
- MENKHORST, E.; SLAMONSEN, L.; ROBB, L.; *et al.* IL11 antagonist inhibits uterine stromal differentiation, causing pregnancy failure in mice. *Biology of Reproduction*, v.80, p.920-927, 2009.
- MEREZHINSKAYA, N. e FISHBEIN, W.N. Monocarboxylate transporters: Past, present, and future. *Histology and Histopathology*, v.24, p.243-264, 2009.
- MILLER, L.; ALLEY, E.W.; MURPHY, W.J.; *et al.* Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v.59, p.442-450, 1996.
- MIYAZAKI, S.; TSUDA, H.; SAKAI, M.; *et al.* Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *Journal of Leukocyte Biology*, v.74, p.514-522, 2003.

- MODI, D.N.; GODBOLE, G.; SUMAN, P.; *et al.* Endometrial biology during trophoblast invasion. *Frontiers in Bioscience*, S4, p.1151-1171, 2012.
- MOFFETT, A. e LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature*, v.6, p.584-594, 2006.
- MOFFETT-KING, A. Natural Killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, v.2, p.656-663, 2002.
- MÖJOSBERG, J.; BERG, G.; JENMALM, M.C.; *et al.* FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biology of Reproduction*, v.82, p.698-705, 2010.
- MONK, J.M.; LEONARD, S.; McBEY, B.A.; *et al.* Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. *Placenta*, v.26, p.835-838, 2005.
- MONTECINO-RODRIGUEZ, E. e DORSHKIND, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. *TRENDS in Immunology*, v.27, n.9, p.428-433, 2006.
- MONTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology*, v.25, n.12, p.677-686, 2004.
- MONTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TRENDS in Immunology*, v.23, n.11, 549-555, 2002.
- MORETTA, A.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; *et al.* Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*, v.21, n.5, p.228-234, 2000.
- MÜLLER, H.; LIU, B.; CROY, B.A.; *et al.* Uterine Natural Killer Cells Are Targets for a Trophoblast Cell-Specific Cytokine Prolactin-Like Protein A. *Endocrinology*, v.140, n.6, p.2711-2720, 1999.
- MURAKOSHI, H.; MATSUO, H.; LAOAG-FERNANDEZ, J.B.; *et al.* Expression of Fas/Fas-ligand, Bcl-2 protein and apoptosis in extravillous trophoblast along invasion to the decidua in human term placenta. *Endocrine Journal*, v.50, n.2, p.199-207, 2003.
- MURPHY, S.P.; FAST, L.D.; HANNA, N.N.; *et al.* Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *Journal of Immunology*, v.175, p.4084-4090, 2005.
- MURPHY, S.P.; HANNA, N.N.; FAST, L.D.; *et al.* Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. *American Journal of Obstetric and Gynecology*, v.200, n.3, 308, p.e-1-e9, 2009.
- MUZZIO, A.M.; NOYES, P.D.; STAPLETON, H.M.; *et al.* Tissue distribution and thyroid hormone effects on mRNA abundance for membrane transporters Mct8, Mct10, and organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in a teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.167, p.77-89, 2014.
- MUZZIO, D.; ZENCLUSSEN, A.C.; JENSEN, F. The role of B cells in pregnancy: the good and the bad. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.69, p.408-412, 2013.
- MYATT, L. e CUI, X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.*, v.122, p.369-382, 2004.
- MYATT, L.; EIS, A.L. W.; BROCKMAN, D.E.; *et al.* Inducible (Type II) nitric oxide synthase in human placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Placenta*, v.18, n.4, p.261-268, 1997.
- NAGAMATSU, T. e SCHUST, D.J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p.460-471, 2010.
- NAKASHIMA, A.; ITO, M.; SHIMA, T.; *et al.* Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.64, p.4-11, 2010.
- NANCY, P.; TAGLIANI, E.; TAY, C.-S.; *et al.* Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science*, v.336, p.1317-1321, 2012.

- NARUSE, K.; LASH, G.E.; BULMER, J.N.; *et al.* The Urokinase Plasminogen Activator (uPA) System in Uterine Natural Killer Cells in the Placental Bed During Early Pregnancy. *Placenta*, v.30, p.398-404, 2009.
- NAVAS, P.B.; MOTTA, A.B.; HAPON, M.B.; *et al.* Hyperthyroidism advances luteolysis in the pregnant rat through changes in prostaglandin balance. *Fertil. Steril.* v.96, p.1008-1014, 2011.
- NIKOLAEVICH, K.N.; IVANOVICH, S.J.; VICTOROVICH, S.S. Major reproduction hormones as regulators of cell-to-cell interactions in humoral immune responses. *Bain, Behavior, and Immunity*, v.5, p.149-161, 1991.
- OCHOA, M.T.; LONCARIC, A.; KRUTZIK, S.R.; *et al.* "Dermal Dendritic Cells" Comprise Two Distinct Populations: CD1<sup>+</sup> Dendritic Cells and CD209<sup>+</sup> Macrophages. *Journal of Investigative Dermatology*, v.128, p.2225-2231, 2008.
- OH, M.J. e CROY, B.A. A Map of Relationships Between Uterine Natural Killer Cells and Progesterone Receptor Expressing Cells During Mouse Pregnancy. *Placenta*, v.29, p.317-323, 2008.
- OKI, N.; MATSUO, H.; NAKAGO, S.; *et al.* Effects of 3,5,3'-Triiodothyronine on the Invasive Potential and the Expression of Integrins and Matrix Metalloproteinases in Cultured Early Placental Extravillous Trophoblast. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.89, n.10, p.5213-5221, 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.
- ONG, S.S.; BAKER, P.N.; MAYHEW, T.M. *et al.* Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 192, p.572-579, 2005.
- ORWIG, K.E.; RASMUSSEN, C.A.; SOARES, M.J. Decidual signals in the establishment of pregnancy: the prolactin family- A Review. *Trophoblast Researsh.* v.10, p.329-343, 1997.
- OSOL, G. e MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during Pregnancy. *Physiology*, v.24, p.58-71, 2009.
- PAFFARO, V.A.; BIZINOTTO, M.C.; JOAZEIRO, P.P.; *et al.* Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells by DBA Lectin Reactivity. *Placenta*, v.24, p.479-488, 2003.
- PAPAPETROPOULOS, A.; GARCIA-CARDEÑA, G.; MADRI, J.A.; *et al.* Nitric Oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v.100, n.12, p.3131-3139, 1997.
- 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.
- PARK, J.E.; CHEN, H.H.; WINER, J.; *et al.* Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but nt to Flk-1/KDR+. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.42, p.25646-25654, 1994.
- PARR, E.L.; PARR, M.B.; ZHENG, L.M.; *et al.* Mouse granulated metrial gland cells originate by local activation of uterine natural killer lymphocytes. *Biology of Reproduction*, v.44, p.834-841, 1991.
- PATEL, J.; LANDERS, K.; LI, H.; *et al.* Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Tends in Endocrinology and Metabolism*, v.22, n.5, p.164-170, 2011.
- PAWAR, S.; HANTAK, A.M.; BAGCHI, I.C.; *et al.* Minireview: Steroid-Regulated Paracrine Mechanisms Controlling Implantation. *Molecular Endocrinology*, v.28, n.9, p.1408-1422, 2014.
- PEEL, S. e STEWART, I. Rat granulated metrial gland cells differentiate in pregnant chimeric mice and may be cytotoxic for mouse trophoblast. *Cell Differentiation and Development*, v. 28, p.55-64, 1989.
- PEEL, S.; STEWART, I.J.; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. *Cell Tissue Research*, v.233, p.647-656, 1983.

- PEYMAN, J.A. e HAMMOND, G.L. Localization of IFN-gamma receptor in first trimester placenta to trophoblasts but lack of stimulation of HLA-DRA, -DRB, or invariant chain m RNA expression by IFN-gamma. *The Journal of Immunology*, v.149, n.8, p.2675-2680, 1992.
- PHILIPS, H.S.; HAINS, J.; LEUNG, D.W.; *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor is Expressed in Rat Corpus Luteum. *Endocrinology*, v.127, n.2, 1990.
- PICCINNI, M.-P.; BELONI, L.; LIVI, C.; *et al.* Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Medicine*, v.4, n.9, p.1020-1024, 1998.
- PICKARD, M.R.; LEONARD, A.J.; OGILVIE, L.M.; 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.
- PICUT, C.A.; SWANSON, C.L.; PARKER, R.F.; *et al.* the metrial gland in the rat and its similarities to granular cell tumors. *Toxicologic Pathology*, v.37, p.474-480, 2009.
- PIJNENBORG, R. e VERCRUYSSSE, L. Animal models of deep trophoblast invasion. In: Pijnenborg R, Brosens I, Romero R, editors. Placental bed disorders. Cambridge: Cambridge University Press. 127-139, 2010.
- PIJNENBORG, R. The origin and future of placental bed research. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v.81, p.185-190, 1998.
- PIJNENBORG, R.; BLAND, J.M.; ROBERTSON, W.B.; *et al.* Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, v.4, p.397-414, 1983.
- PIJNENBORG, R.; DIXON, G.; ROBERTSON, W.B.; *et al.* Trophoblastic Invasion of Human Decidua From 8 to 18 Weeks of Pregnancy. *Placenta*, v.1, p.3-19, 1980.
- PIJNENBORG, R.; ROBERTSON, W.B.; BRISENS, I.; *et al.* Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*, v.2, p.71-91, 1981.
- PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; CARTER, A.M. Deep trophoblast invasion and spiral artery remodeling in the placental bed of the chimpanzee. *Pacenta*, v. 32, p.400-408, 2011.
- PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; HANSSSENS, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*, v.27, p.939-958, 2006.
- PLAISIER, M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v.25, p.259-271, 2011.
- 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.
- PLAKS, V.; BIRNBERG, T.; BERKUTZKI, T.; *et al.* Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.12, p.3954-3965, 2008.
- POLLARD, J.W.; BARTOCCI, A.; ARCECI, R.; *et al.* Apparent role of the macrophage growth factor, CSF-1, in placental development. *Nature*, v.330, p.484-486, 1987.
- POLLARD, J.W.; HUNT, J.S.; WOCTOR, W.; *et al.* A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Developmental Biology*, v.148, p.273-283, 1991.
- POPOVICI, R.M.; KAO, L.C.; GIUDICE, L.C. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, v.141, p.3510-3513, 2000.
- POPPE, K. e GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Human Reproduction Update*, v.9, n.2, p.149-161, 2003.

- POPPE, K. e VELKENIERS, B. Female infertility and the thyroid. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.18, n.2, p.153-165, 2004.
- POPPE, K.; VELKENIERS, B.; GLINOER, D. The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, v. 4, n.7, p.394-405 2008.
- POPPE, K.; VELKENIERS, B.; GLINOER, D. Thyroid disease and female reproduction. *Clinical Endocrinology*, v.66, p.309-321, 2007.
- PORAKISHVILI, N.; MAGEED, R.; JAMIN, C.; *et al.* Recent Progress in the Understanding of B-Cell Functions in Autoimmunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, v.54, p.30-38, 2001.
- PURCELL, T.L.; BUHIMSCHI, I.A.; GIVEN, R.; *et al.* Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal-maternal interface and decreases prior to labour. *Molecular Human Reproduction*, v.3, n.6, p.485-491, 1997.
- QIU, X.; ZHU, L; POLLARD, J.W. Colony-Stimulating Factor-1-Dependent Macrophage Functions Regulate the Maternal Decidua Immune Responses against *Listeria monocytogenes* infections during early gestation in mice. *Infection and Immunity*, v.77, n.1, p.85-97, 2009.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Immunology*, v.13, p.219-227, 2001.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today*, v.18, p.478-82, 1997.
- RAMATHAL, C.Y.; BAGCHI, I.C.; TAYLOR, R.N.; *et al.* Endometrial decidualization: of mice and men. *Seminars Reproductive and Medicine*, v.28, n.1, p.17-26, 2010.
- RAMOS, C.F. e, ZAMONER, A. Thyroid hormone and leptina in the testis. *Frontiers in Endocrinology*, v.5, Artic.198, p.1-12, 2014.
- RANI, N., DHINGRA, R.; ARYA, D.S.; *et al.* Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclamptic patients. *Journal of Obstetric and Gynaecology Research*, v.36, n.6, p.1189-1194, 2010.
- RAO, K.M.K. e COHEN, H.J. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutation Research*, v.256, p.139-148, 1991.
- RÄTSEP, M.T.; FELKER, A.M.; KAY, V.R.; *et al.* Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction*, v.149, p.R91-R102, 2015.
- RAULET, D.H. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in Immunology*, v.18, p.145-150, 2006.
- RECHTMAN, M.P.; ZHANG, J.; SALAMONSEN, A. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on endometrial decidualization and implantation in mated rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.117, p.169-177, 1999.
- RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; *et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.*, v.114, n.6, p.744-754, 2004.
- REDLINE, R.W. Villitis of unknown etiology: noninfectious chronic villitis in the placenta. *Human Pathology*, v.38, p.1439-1446, 2007.
- 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.
- REISTER, F.; FRANK, H.-G.; HEYL, W.; *et al.* The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients. *Placenta*, v.20, p.229-233, 1999.

- RENAUD, S.J. e GRAHAM, C.H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunological Investigation*, v.37, p.535-564, 2008.
- REPNIK, U.; TILBURG, T.; ROELEN, D.L.; *et al.* Comparison of macrophage phenotype between decidua basalis and decidua parietalis by flow cytometry. *Placenta*, v.29, p.405-412, 2008.
- 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.
- RIEGER, L.; HONIG, A.; SÜTTERLIN, M.; *et al.* Antigen-Presenting Cells in Human Endometrium During the Menstrual Cycle Compared to Early Pregnancy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v.11, n.7, p.488-493, 2004.
- RILEY, J. K. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance. *Immunological Investigation*, v.37, p.395-426, 2008.
- ROBERTSON, S.A.; CARE, A.S.; SKINNER, R.J. Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. *Biology of Reproduction*, v.76, p.738-748, 2007.
- ROBERTSON, W.B.; BROSENS, I.; LANDELLS, W.N.; *et al.* Abnormal placentation. *Obstetrics and Gynecology Annual*, v.14, p.411-426, 1985.
- ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; KUSANOVIC, J.P.; *et al.* The preterm parturition syndrome. *BJOG*, v.113, suppl.3, p.17-42, 2006.
- ROSARIO, G.X.; KONNO, T.; SOARES, M.J. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Developmental Biology*, v.314, p.362-375, 2008.
- ROWE, J.H.; ERTELT, J.M.; AGUILERA, M.N.; *et al.* Article Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Expansion Required for Sustaining Pregnancy Compromises Host Defense against Prenatal Bacterial Pathogens. *Cell Host and Microbe*, v.10, n.1, p.54-64, 2011.
- ROWE, J.H.; ERTELT, J.M.; XIN, L.; *et al.* Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, v.490, p.102-106, 2012.
- SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; *et al.* Th1/Th2/Th17 and Regulatory T- Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p.601-610, 2010.
- SALAMONSEN, L.A. Role of proteases in implantation. *Reviews of Reproduction*, v.4, p.11-22, 1999.
- SALAMONSEN, L.A.; DIMITRIADIS, E.; NICE, J.G. Complex Regulation of Decidualization: a Role for Cytokines and Proteases- A Review. *Placenta*, v.24, suppl.A, p.S76-S85, 2003.
- SALAMONSEN, L.A.; HAMPTON, A.L.; SUZUKI, R.; *et al.* Modulation of production of matrix metalloproteinases from ovine endometrial cells by ovine trophoblast interferon. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.102, p.155-162, 1994.
- SALAMONSEN, L.A.; NIE, G.; FINDLAY, J.K. Newly identified endometrial genes of importance for implantation. *Journal of reproductive immunology*, v.53, p.215-225, 2002.
- SAMSTEIN, R.M.; JOSEFOWICZ, S.Z.; ARVEY, A.; *et al.* Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*, v.150, p.29-38, 2012.
- SAPPINO, A.-P.; HUARTE, J.; BELIN, D.; *et al.* Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *The Journal of Cell Biology*, v.109, p.2471-2479, 1989.
- SASAKI, Y.; DARMOCHWAL-LOLARZ, D.; SUZUKI, D.; *et al.* Proportion of peripheral blood and decidual CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells in pre- eclampsia. *Clinical and Experimental Immunology*, v.149, p.139-145, 2007.
- SASAKI, Y.; SAKAI, M.; MIYAZAKI, S.; *et al.* Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in

- early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular Human Reproduction*, v.10, n.5, p.347-353, 2004.
- SATO, N.; NARIUCHI, H.; TSURUOKA, N.; *et al.* Actions of TNF and IFN- $\gamma$  on Angiogenesis In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*, v.95, p.855-895, 1990.
- SCHONKEREN, D.; VAN DER HOORN, M.-L.; KHEDOE, P.; *et al.* Differential distribution and phenotype of decidual macrophages in preeclamptic versus control pregnancies. *The American Journal of Pathology*, v.178, n.2, p.709-717, 2011.
- SCHULTZ, J.F.; MAYERNIK, L.; ROUT, J.K.; *et al.* Integrin trafficking regulates adhesion to fibronectin during differentiation of mouse peri-implantation blastocysts. *Developmental Genetics*, v.21, p.31-43, 1997.
- SCHUMACHER, A.; COSTA, S.-D.; ZENCLUSSEN, A.C. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v.5, artigo 196, p.1-12, 2014.
- SEIDENSPINNER, T.; TETENS, J.; HABIER, D.; *et al.* The placental growth factor (PGF)--a positional and functional candidate gene influencing calving ease and stillbirth in German dairy cattle. *Animal Genetic*; v.42, p.22-27, 2011.
- SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc. Moscow, 2th ed., p.305-325, 2003.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; *et al.* Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, v.45, p.258-264, 2001.
- SHAAMASH, A.H.; ELSONOSY, E.D.; ZAKHARI, M.M.; *et al.* Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetric*, v.72, p.127-133, 2001.
- SHARKEY, A.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; BOOCOOCK, C.A.; *et al.* Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, p.609-615, 1993.
- SHARKEY, A.M.; DAY, K.; McPHERSON, A.; *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Endometrium Is Regulated by Hypoxia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.85, p.402-409, 2000.
- SHARKEY, A.W. e SMITH, S.K. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice and Research Clinical Obstetric and Gynaecology*, v.17, n.2, p.289-307, 2003.
- SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.75, p.341-350, 2016.
- 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, n.4, p.278-286, 2008.
- SHORE, V.H.; WANG, T.-H.; WANG, C.-L.; *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor, Placenta Growth Factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*, v.18, p.657-665, 1997.
- SHORTMAN, K. e LIU, Y.J. Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes. *Nature Review*, v.2, p.151-161, 2002.
- SILVA, C.M.; SERAKIES, 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.
- SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; VIEIRA, A. L. S.; *et al.* Effects of Hypo- and Hyperthyroidism on Proliferation, Angiogenesis, Apoptosis and Expression of COX-2 in the Corpus Luteum of Female Rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.691-698, 2013.

- SILVA, J.F. e SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adhesion and Migration*, v.10, .1-23, 2016.
- SILVA, J.F., OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. *Pathology Research and Practice*, v.211, p.226-234, 2015.
- SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental gene profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. *Reproduction*, v.147, p.803-816, 2014.
- SILVA, J.F.; VIDIGAL, P.N.; GALVÃO, D.D; *et al.* Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, n.7, p. 923-931, 2012.
- SIMONIDES, W.S.; MULCAHEY, M. A.; REDOUT, E.M.; *et al.* Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.3, p. 975-983, 2008.
- SINGH, M.; CHAUDHRY, P.; ASSELIN, E. Bridging endometrial receptivity and implantation\_network of hormones, cytokines, and growth factors. *Journal of Endocrinology*, v.201, p.5-14, 2011.
- SLAYDEN, O.D. e KEATOR, C.S. Role of progesterone in nonhuman primate implantation. *Seminars in reproductive medicine*, v.25, p.418-430, 2007.
- SMITH, S.D.; DUNK, C.E.; APLIN, J.D.; *et al.* Evidence for Immune Cell Involvement in Decidual Spiral Arteriole Remodeling in early Human Pregnancy. *American Journal of Pathology*, v.174, n.5, p.1959-1971, 2009.
- SOARES, M.J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004.
- SOARES, M.J.; CHAKRABORTY, D.; RUMI, M A.K.; *et al.* Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, v.33, n.4, p.233-243, 2012.
- SOILLEUX, E.J.; MORRIS, L.S.; LEE, B.; *et al.* Placental expression of DC- SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *Journal of Pathology*, v.195, p.586-592, 2001.
- SOILLEUX, E.J.; MORRIS, L.S.; LESLIE, G.; *et al.* Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, v.71, p.445-457, 2002.
- SOLBERG, H.; RINKENBERGER, J.; DANO, K.; *et al.* A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development*, v.130, p.4439-4450, 2003.
- 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.
- SRIVASTAVA, R.K.; GU, Y.; AYLOO, S.; *et al.* Developmental expression and regulation of basic FGF factor and VEGF in rat decidua and in a decidual cell line. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.21, p.355-362, 1998.
- STEWART, I. e PEE, S. Effect of serum on mouse granulated metrial gland cell cytotoxicity. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.41, p.286-292, 1999a.
- STEWART, I. e PEE, S. Granulated Metrial Gland Cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anatomy and Embryology*, v.160, p.227-238, 1980.
- STEWART, I. e PEE, S. Mouse granulated metrial gland cell cytotoxicity of wehi 164 cells: is there a role for Interleukin-3 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ? *American Journal of Reproductive Immunology*, v.41, p.423-427, 1999b.
- STEWART, I. e PEEL, S. The Differentiation of the Decidua and the Distribution of Metrial Gland Cells in the Pregnant Mouse Uterus. *Cell and Tissue Research*, v.187, p.167-179, 1978.



- STEWART, I. e PEEL, S. The structure and differentiation of granulated metrial gland cells of the pregnant mouse uterus. *Cell and Tissue Research*, v.184, p.517-527, 1977.
- STOKER, T.E.; GUIDICI, D.L.; LAWS, S.C.; *et al.* The effects of atrazine metabolites on puberty and thyroid function in the male wistar rat. *Toxicological Sciences*, v.67, p.198-2006, 2002.
- STRAKOVA, Z.; SRISUPARR, S.; FAZLEABAS, A.T. Interleukin-1 beta induces the expression of insulin-like growth factor binding protein during decidualization in the primate. *Endocrinology*, v.141, n.12, p.4664-4670, 2000.
- STRBO, N.; LASKARIN, G.; CRNCIC, T.B.; *et al.* Short-term Cytolytic Mediators' Expression in Decidual Lymphocytes is Enhanced by Interleukin-15. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.55, p.217-225, 2006.
- SUNDERKÖTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; *et al.* Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v.55, p.410-422, 1994.
- SURI, C.; JONES, P.F.; PATAN, S.; *et al.* Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie-2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell*, v.87, p.1171-1180, 1996.
- SUTHERLAND, A.E.; CALARCO, P.G.; DAMSKY, C.H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*, v.119, p.1175-1186, 1993.
- SUZUKI, S.; MORI, J-I.; KOBAYASHI, M.; *et al.* Presence of Functional Domains in NADPH-dependent Cytosolic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>)-binding protein (p38CTBP) Molecule: Analyses with Deletion Mutants. *Hormone Metabolism Research*, v.35, p.577-582, 2003.
- SVENSSON, J.; JENMALM, M.C.; MATUSSEK, A.; *et al.* Macrophages at the Fetal-Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10. *Journal of Immunology*, v.187, p.3671-3682, 2011.
- TAGLIANI, E. e ERLEBACHER, A. Dendritic cell function at the maternal-fetal interface. *Expert Review of Clinical Immunology*, v.7, n.5, p.593-602, 2011.
- TAGLIANI, E.; SHI, C.; NANCY, P.; Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. *The Journal of Experimental Medicine*, v.208, n.9, p.1901-1916, 2011.
- TAYADE, C.; FANG, Y.; BLACK, G.P.; *et al.* Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v.78, p.1347-1355, 2005.
- TAYADE, C.; HILCHIE, D.; HE, H.; *et al.* Genetic Deletion of Placenta Growth Factor in Mice Alters Uterine NK Cells. *Journal of Immunology*, v.178, p.4267-4275, 2007.
- TEESALU, T.; BLASI, F.; TALARICO, D. Embryo implantation in mouse fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and  $\alpha_2$ MR/LRP genes. *Mechanisms of Development*, v.56, p.103-116, 1996.
- TEESALU, T.; BLASI, F.; TALARICO, D. Expression and Function of the urokinase-type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. *Developmental Dynamics*, v.213, p.27-38, 1998.
- TELGSMANN, R. e GELLERSEN, B. Marker genes of decidualization activation of the decidual prolactin gene. *Human Reproduction Update*, v.4, n.5, p.472-479, 1998.
- TESSIER, C.; DEB, S.; PRIGENT-TESSIER, A. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology*, v.141, p.3842-3851, 2000.
- TESSIER, C.; PRIGENT-TESSIER, A.; FERGUSON-GOTTSCHELL, S.; *et al.* PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology*, v.142, n.9, p.4086-4094, 2001.
- THAXTON, J.E. e SHARMA, S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.63, p.482-491, 2010.

THORPE-BEESTON, J.G.; NICOLAIDES, K.H.; FELTON, C.V.; *et al.* Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone in the fetus. *The New England Journal of Medicine*, v.324, n.8, p.532-536, 1991.

TILBURGS, T.; CLAAS, F.H.J.; SCHERJON, S.A. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture Unique Properties of Decidual T Cells and their Role in Immune Regulation during Human Pregnancy. *Placenta*, v.24, p.582-586, 2010.

TILBURGS, T.; ROELEN, D.L.; VAN DER MAST, B.J.; *et al.* Differential Distribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-cells in Decidua and Maternal Blood During Human Pregnancy. *Placenta*, v.27, suppl.A, p.S47-S53, 2006.

TILBURGS, T.; ROELEN, D.L.; VAN DER MAST, B.J.; *et al.* Evidence for a Selective Migration of Fetus-Specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> Regulatory T Cells from the Peripheral Blood to the Decidua in Human Pregnancy. *Journal of Immunology*, v.180, p.5737-5745, 2008.

TILBURGS, T.; SCHERJON, S.A.; VANDER MAST, B.J.; *et al.* Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. *Journal of Reproductive Immunology*, v.82, p.148-157, 2009.

TOBERT, J.A. A study of the possible role of prostaglandins in decidualization using a nonsurgical method for the instillation of fluids into the uterine lumen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.47, p.391-393, 1976.

TODER, V.; FEIN, A.; CARP, H.; *et al.* TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.20, p.73-81, 2003.

TORRY, D.S.; AHN, H.; BARNES, E.L.; *et al.* Placenta Growth Factor: Potential Role in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.41, p.79-85, 1999.

TORRY, D.S.; HINRICHS, M. e TORRY, R.J. Determinants of placental vascularity. *American Journal of Reproduction Immunology*, v.51, p.257-268, 2004.

TORRY, D.S.; HOLT, V.J.; KEENAN, J.A.; *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in cycling human endometrium. *Fertility and Sterility*, v.66, n.1, p.72-80, 1996.

TRANCHOT-DIALLO, J.; GRAS, G.; PARNET-MATHEU, F.; *et al.* Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Journal of Reproductive Immunology*, v.37, p.215-226, 1997.

TSAI, M.-J. e O'MALEY, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid\_thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry*, v.63, p.451-486, 1994.

TWIG, G.; SHINA, A.; AMITAL, H. *et al.* Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. In Press, 1-7, 2012.

VAN DEN HEUVEL, M.J.; CHANTAKRU, S.; SIE, X.; *et al.* Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus; regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunology Investigation*, v.34, n.3, p.273-293, 2005.

VARALLO, G.R.; SEMOLIN, L.M.S.; RAPOSO, T.M.M.; *et al.* Estudo epidemiológico e achados laboratoriais de cães hipotireoideos atendidos no Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” no período de janeiro de 2004 a fevereiro de 2010. *Revista Ciência Veterinária e Saúde Pública*, v.1, n.1, p.15-21, 2014.

VAROL, C.; YONA, S.; JUNG, S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunology and Cell Biology*, v.87, p.30-38, 2009.

VASILOPOULOU, E.; LOUBIÈRE, L.S.; HEUER, H.; *et al.* Monocarboxylate transporter 8 modulates the viability and invasive capacity of human placental cells and fetoplacental growth in mice. *PLOS ONE*, v.8, n.6, e65402, p.1-14, 2013.

- VASILOPOULOU, E.; LOUBIÈRE, L.S.; LASH, G.E.; *et al.* Triiodothyronine regulates angiogenic growth factor and cytokine secretion by isolated human decidual cells in a cell-type human decidual cells in a cell-type specific and gestational age-dependent manner. *Human Reproduction*, v.1, n.0, p.1-12, 2014.
- VASILOPOULOU, E.; LOUBIÈRE, L.S.; MARTIN-SANTOS, A.; *et al.* Differential Triiodothyronine Responsiveness and Transport by Human Cytotrophoblasts from Normal and Growth-Restricted Pregnancies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.95, n.10, p.4762-4770, 2010.
- VERCRUYSSSE, L.; CALUWAERTS, S.; LUYTEN, C.; *et al.* Interstitial Trophoblast Invasion in the Decidua and Mesometrial Triangle During the Last Third of Pregnancy in the Rat. *Placenta*, v.27, p.22-23, 2006.
- VERLHAC, M.H.; KUBIAK, J.Z.; CLARKE, H.J.; *et al.* Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, v.120, p.1017-1025, 1994.
- VERMA, S.; HIBY, S.E.; LOKE, Y.W.; *et al.* Human Decidual Natural Killer Cells Express the Receptor for and Respond to the Cytokine Interleukin 15. *Biology of Reproduction*, v.62, p.959-968, 2000.
- VIGANÒ, P.; CINTORINO, M.; SCHATZ, F.; *et al.* The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Seminars in Immunopathology*, v.29, p.135-150, 2007.
- VINCE, G.S.; STARKEY, P.M.; JACKSON, M.C.; *et al.* Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages. *Journal of Immunology Methods*, v.132, p.181-189, 1990.
- VISSE, R. e NAGASE H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*, v.92, p.827-839, 2003.
- VISSER, W.E.; FRIESEMA, C.H.; JAJSEN, J.; *et al.* Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.19, n.2, p.50-57, 2008.
- 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. *Endocrinology*, v.33, p. 53-61, 2008.
- 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.
- VUORELA, P.; HATVA, E.; LYMBOUSSAKI, A.; *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biology of Reproductions*, v.56, p.489-494, 1997.
- WAGNER, M.S.; WAJENER, S.M.; MAIA, A.L. The Role of Thyroid Hormone in Testicular Development and Function. *Journal of Endocrinology*, v.199, n.3, p.351-365, 2008.
- WAGNER, M.S.; WAJNER, S.M.; MAIA, A.L. Is There a Role for Thyroid Hormone on Spermatogenesis? *Microscopy Research and Technique*, v.72, p.796-808, 2009.
- WANG, B.; BIRON, C.; SHE, J.; *et al.* A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human *CD3E* gene. *Immunology*, v.91, p.9402-9406, 1994.
- WANG, C.; TANAKA, T.; NAKAMURA, H.; *et al.* Granulated Metrial Gland Cells in the Murine Uterus: Localization, Kinetics, and the Functional Role in Angiogenesis During Pregnancy. *Microscopy Research and Technique*, v.60, p.420-429, 2003.
- WANG, C.; UMESAKI, N.; NAKAMURA, H.; *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res.*, v.300, p.285-293, 2000.
- WANG, H. e DEY, S.K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Genetics Review*, v.7, p.185-199, 2006.
- WASCO, E.C.; MARTINEZ, E.; GRANT, K.S.; *et al.* Determinants of iodothyronine deiodinase activities in rodent uterus. *Endocrinology*, v.144, n.10, p.4253-44261, 2003.

- WATERHOUSE, P.; DENHARDT, D.T.; KHOKHA, R. Temporal expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in mouse reproductive tissues during gestation. *Molecular Reproduction and Development*, v.35, n.3, p.219-226, 1993.
- WEINBERG, E.D. Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microbial Pathogenesis*, v.3, p.393-97, 1987.
- WEITLAUF, H.M. *Biology of implantation*. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. The Physiol. Reprod.. 2. Ed., New York: Raven Press, Ltd., Cap.7, p.391-440, 1994.
- 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.St.J. e CARTWRIGHT, J.E. Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling Lessons from the Cardiovascular Field. *Placenta*, v.31, p.465-474, 2010.
- WILLIAMS, S.A.; XIA, L.; CUMMINGS, R.D.; *et al.* Fertilization in mouse does not require terminal galactose or N-acetylglucosamine on the zona pellucida glycans. *Journal of Cell Science*, v.120, p.1341-1349, 2007.
- WOOD, G.W.; SANFORD, M.T.; CHOUDHRI, R. Macrophage colony stimulating factor controls macrophage recruitment to the cycling mouse uterus. *Developmental Biology*, v.152, p.336-343, 1992.
- WULFF, C.; WILSON, H.; DICKSON, S.E.; *et al.* Hemochorial Placentation in the Primate: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Angiopoietins, and Their Receptors Throughout Pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.66, p.802-812, 2002.
- WYNN, R.M. Development and ultrastructural adaptations of the human placenta. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, v.5, n.1-2, 3-21, 1975.
- XIE, X.; KANG, Z.; ANDERSON, L.N.; *et al.* Analysis of the contributions of L-selectin and CXCR3 in mediating leukocyte homing to pregnant mouse uterus. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.53, p.1-12, 2005.
- XU, P.; WANG, Y.-L.; ZHU, S.-J.; *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2,-9, and-14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biology of Reproduction*, v.62, p.988-994, 2000.
- YADI, H.; BURKE, S.; MADEJA, Z.; *et al.* Unique Receptor Repertoire in Mouse Uterine NK Cells. *The Journal of Immunology*, v.181, p.6140-6147, 2008.
- YANG, H.; QIU, L.; CHEN, G.; *et al.* Proportional change of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *Fertility and Sterility*, v. 89, n. 3, p. 656-661, 2008.
- YE, W.; ZHENG, L.M.; YOUNG, J.D.E.; *et al.* The Involvement of Interleukin (IL) -15 in Regulating the Differentiation of Granulated Metrial Gland Cells in Mouse Pregnant Uterus. *The Journal of Experimental Medicine*, v.184, p.2405-2410, 1996.
- YING, Y. e ZHAO, G.-Q. Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, *Smad1*, during mouse decidualization. *Biology of reproduction*, v.63, p.1781-1786, 2000.
- YOUINO, P.; JAMIN, C.; PERS, J.-O.; *et al.* B lymphocytes are required for development and treatment of autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy Sciences*, v.1050, p.19-33, 2005.
- YOUNG, B.C.; LEVINE, R.J.; KARUMANCHI, S.AN. Pathogenesis of preeclampsia. *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease Journal*, v.5, p.173-192, 2010.
- YU, H.; FEHNIGER, T.A.; FUCHSHUBER, P.; *et al.* Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34<sup>+</sup> Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15. *Blood*, v.92, n.10, p.3647-3657, 1998.
- YUAN, K. e LIN, M.T. The roles of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 in the regression of pregnancy pyogenic granuloma. *Oral Disease*, v.10, p.179-185, 2004.

- ZACHAREK, A.; CHEN, J.; CUI, X.; *et al.* Angiopoietin1/Tie-2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v.27, p.1684-1691, 2007.
- ZAMONER, A. CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; *et al.* Involvement of calcium-dependent mechanisms in T<sub>3</sub>-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sciences*, v.77, p.3321-3335, 2005.
- ZAMONER, A.; PESSA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Membrane-Inotoated Actions of Thyroid Hormones on the Male Reproductive System. *Life Sciences*, v.89, p.507-514, 2011.
- ZAMONER, Z.; PIEROZAN, P.; VIDAL, L.F.; *et al.* Vimentin phosphorylation as a target of cell signaling mechanisms induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in immature rat testes. *Steroids*, v.73, p.1400-1408, 2008.
- ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; GONÇALVES, R.; *et al.* Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. *BBA- Gen. Subjects*, v.1830, p.2629-2637, 2013.
- ZENCLUSSEN, A.C.; GERLOF., K.; ZENCLUSSEN, M.L.; *et al.* Abnormal T-Cell Reactivity against Paternal Antigens in Spontaneous Abortion. *American Journal of Pathology*, v.166, n.3, p.812-822, 2005
- ZHANG, E.G.; BURTON, G.J.; SMITH, S.K.; *et al.* Placental Vessel Adaptation During Gestation and to High Altitude\_Changes in Diameter and Perivascular Cell Coverage. *Placenta*, v.23, p.751-762, 2002.
- ZHANG, J.; CHEN, Z.; SMITH, G.N.; *et al.* Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cellular and Molecular Immunology*, v.8, p.1-11, 2011.
- ZHANG, J.; DUNK, C.; CROY, A.B.; *et al.* To serve and to protect: the role of decidual innate immune cells on human pregnancy. *Cell Tissue Research*, v.363, p.249-265, 2016.
- ZHANG, J.; SUN, R.; WEI, H.; *et al.* Toll-like receptor 3 agonist enhances IFN-gamma and TNF-alpha production by murine uterine NK cells. *Int. Immunopharmacol.*, v.7, p.588-596, 2007.
- ZHANG, J.H.; YAMADA, A.T.; CROY, B.A. DBA-lectin Reactivity Defines Natural Killer Cells that have Homed to Mouse Decidua. *Placenta*, v.30, p.968-973, 2009.
- ZHANG, Y.-H.; HE, M.; WANG, Y.; *et al.* Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v.8, art.120, p.1-12, 2017.
- ZHENG, L.M.; JOAG, S.V.; BARR, M.B.; *et al.* Perforin-expressing granulated metrial gland cells in murine deciduoma. *Journal of Experimental Medicine*, v.174, p.1221-1226, 1991.
- ZHOU, Y.; BELLINGARD, V.; FENG, K.-T.; *et al.* Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang-2 PIGF and VEGF-C. *Developmental Biology*, v.263, n.114-125, 2003.
- ZHOU, Y.; FISHER, S.J.; JANATPOUR, M; *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of Clinical Investigation*, v.99, n.9, p.213902151, 1997.
- ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; *et al.* Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 110, p. S10-S18, 2003.



## ANEXOS

### ANEXO I



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

#### CERTIFICADO

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

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

#### CERTIFICATE

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

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

Belo Horizonte, 15 de Março de 2012.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

(Mod Cert. v1.0)

## ANEXO 2 – Aceite do Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira

13/10/2017

Gmail - Fwd: Prova para publicação na PVB, Trabalho Vet 2353 pvb-4941.R1 MF



Cintia Almeida <cintia.randt@gmail.com>

---

### Fwd: Prova para publicação na PVB, Trabalho Vet 2353 pvb-4941.R1 MF

1 mensagem

---

Rogéria Serakides <serakidesufmg@gmail.com>  
Para: Cintia Almeida <cintia.randt@gmail.com>

27 de setembro de 2017 13:47

*Dra. Rogéria Serakides*  
*Professor*  
*Escola de Veterinária*  
*Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).*  
*Av Antonio Carlos, 6627 - Belo Horizonte- 31270901 - MG- Brasil*  
*F: 55 31 3409-2243*

*Coordenador,*  
*Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA)*  
*www.nctca.wordpress.com*

----- Mensagem encaminhada -----

De: Neotecnica Editora <neotecnica@neotecnicaeditora.com.br>  
Data: 26 de setembro de 2017 06:40  
Assunto: Prova para publicação na PVB, Trabalho Vet 2353 pvb-4941.R1 MF  
Para: serakidesufmg@gmail.com

Prezado(a) Autor(a)

Em anexo, estamos enviando a prova final do seu Trabalho Vet 2353 pvb-4941.R1 MF. A prova está em arquivo PDF, que poderá ser aberta no aplicativo **Adobe Acrobat** para conferência e correções (**somente as estritamente necessárias**), utilizando-se para tal, a ferramenta "Nota auto-adesiva" (terceira, da esquerda para a direita, da barra de ferramentas).

**Este Trabalho poderá fazer parte do próximo fascículo *Pesq. Vet. Bras.*, 37 de 2017. Para isto, precisamos da devolução da prova final anexa, até 30.9.2017, pelo e-mail: [neotecnica@neotecnicaeditora.com.br](mailto:neotecnica@neotecnicaeditora.com.br), com o OK para publicação ou com as correções ainda necessárias.**

#### **É FUNDAMENTAL:**

- 1. CONFIRMAR AS CITAÇÕES DE QUADROS E FIGURAS NO TEXTO;**
- 2. FAZER O COTEJAMENTO DAS CITAÇÕES NO TEXTO COM A LISTA DAS REFERÊNCIAS NO FINAL DO TRABALHO.**

**A publicação do seu artigo pode ser confirmada no site da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br))**

[https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=5e02474504&pvver=YpMGO-HWJFg\\_pt\\_BR&view=pt&qs=serakidesufmg%40gmail.com&qt=true&asarc...](https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=5e02474504&pvver=YpMGO-HWJFg_pt_BR&view=pt&qs=serakidesufmg%40gmail.com&qt=true&asarc...) 1/2



### ANEXO 3

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de T<sub>3</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

|                | <b>Controle</b>       | <b>Hipotireoideo</b>  | <b>Tratado com T<sub>4</sub></b> |
|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <b>Dia 0</b>   | 2,345 ±0,289 <b>a</b> | 1,856 ±0,188 <b>b</b> | 2,627 ±0,284 <b>a</b>            |
| <b>19 Dias</b> | 1,757 ±0,281 <b>a</b> | 1,180 ±0,155 <b>b</b> | 1,977 ±0,553 <b>a</b>            |

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

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de T<sub>4</sub> livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com tiroxina aos 0 e 19 dias de gestação.

|                | <b>Controle</b>       | <b>Hipotireoideo</b>  | <b>Tratado com T<sub>4</sub></b> |
|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| <b>Dia 0</b>   | 1,196 ±0,123 <b>a</b> | 0,437 ±0,095 <b>b</b> | 4,732 ±0,891 <b>c</b>            |
| <b>19 Dias</b> | 0,795 ±0,173 <b>a</b> | 0,104 ±0,080 <b>b</b> | 2,460 ±0,643 <b>c</b>            |

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

Tabela 3. Média e desvio padrão da área de Detecção imunistoquímica de VEGF em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de VEGF em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região              |                         | Controle          | Hipotireoideo     | Tratado com T <sub>4</sub> |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| <b>10 Dias</b>                | Área                    | 3,200 $\pm$ 1,514 | 5,336 $\pm$ 1,223 | 2,758 $\pm$ 0,975          |
|                               | <b>Região Lateral</b>   | Intensidade       | 2,129 $\pm$ 1,356 | 4,974 $\pm$ 1,098          |
| <b>10 Dias Região Central</b> | Área                    | 4,873 $\pm$ 2,179 | 7,304 $\pm$ 1,831 | 5,751 $\pm$ 1,021          |
|                               | Intensidade             | 2,129 $\pm$ 1,356 | 4,974 $\pm$ 1,098 | 2,863 $\pm$ 1,160          |
| <b>14 Dias</b>                | Área                    | 0,757 $\pm$ 0,407 | 1,148 $\pm$ 0,213 | 0,740 $\pm$ 0,533          |
|                               | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade       | 0,607 $\pm$ 0,453 | 1,724 $\pm$ 0,493          |
| <b>14 Dias</b>                | Área                    | 1,269 $\pm$ 0,760 | 1,980 $\pm$ 0,682 | 0,838 $\pm$ 0,375          |
|                               | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade       | 1,320 $\pm$ 0,796 | 2,642 $\pm$ 1,139          |
| <b>19 Dias</b>                | Área                    | 2,300 $\pm$ 0,642 | 1,090 $\pm$ 0,628 | 1,591 $\pm$ 1,084          |
|                               | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade       | 1,979 $\pm$ 1,198 | 1,373 $\pm$ 0,757          |
| <b>19 Dias</b>                | Área                    | 2,782 $\pm$ 0,626 | 1,294 $\pm$ 0,759 | 1,770 $\pm$ 1,129          |
|                               | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade       | 2,526 $\pm$ 1,530 | 1,614 $\pm$ 0,887          |

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

Tabela 4. Média e desvio padrão da área de detecção imunohistoquímica de Flk-1 em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de Flk-1 em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região              |                         | Controle       | Hipotireoideo | Tratado com T <sub>4</sub> |
|-------------------------------|-------------------------|----------------|---------------|----------------------------|
| <b>10 Dias</b>                | Área                    | 0,518 ±0,211   | 0,848 ±0,547  | 0,665 ±0,423               |
|                               | <b>Região Lateral</b>   | Intensidade    | 0,664 ±0,260  | 1,088 ±0,693               |
| <b>10 Dias Região Central</b> | Área                    | 0,735 ±0,288   | 1,170 ±0,584  | 1,646 ±0,760               |
|                               | Intensidade             | 0,682 ±0,482   | 1,488 ±0,740  | 2,050 ±0,854               |
| <b>14 Dias</b>                | Área                    | 1,482 ±1,78301 | 2,041 ±0,776  | 0,890 ±0,532               |
|                               | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade    | 1,251 ±1,448  | 2,762 ±1,024               |
| <b>14 Dias</b>                | Área                    | 1,091 ±0,976   | 2,340 ±1,325  | 1,490 ±1,387               |
|                               | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade    | 1,443 ±1,278  | 3,246 ±0,413               |
| <b>19 Dias</b>                | Área                    | 0,572 ±0,576   | 0,069 ±0,038  | 0,010 ±0,010               |
|                               | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade    | 0,809 ±0,811  | 0,096 ±0,052               |
| <b>19 Dias</b>                | Área                    | 0,581 ±0,470   | 0,144 ±0,075  | 0,0367 ±0,047              |
|                               | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade    | 0,610 ±0,742  | 0,199 ±0,104               |

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

Tabela 5. Média e desvio padrão da área de detecção imunohistoquímica de Tie-2 em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de Tie-2 em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região |                         | Controle           | Hipotireoideo     | Tratado com T <sub>4</sub> |
|------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|
| <b>10 Dias</b>   | Área                    | 3,973 $\pm$ 1,127  | 5,800 $\pm$ 1,999 | 3,626 $\pm$ 0,639          |
|                  | <b>Região Lateral</b>   | Intensidade        | 4,917 $\pm$ 1,098 | 6,927 $\pm$ 1,890          |
| <b>10 Dias</b>   | Área                    | 3,729 $\pm$ 2,0427 | 4,997 $\pm$ 1,629 | 4,227 $\pm$ 1,300          |
|                  | <b>Região Central</b>   | Intensidade        | 4,770 $\pm$ 2,390 | 6,226 $\pm$ 1,780          |
| <b>14 Dias</b>   | Área                    | 4,440 $\pm$ 3,200  | 6,688 $\pm$ 2,478 | 5,186 $\pm$ 1,647          |
|                  | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade        | 5,446 $\pm$ 3,732 | 7,910 $\pm$ 2,679          |
| <b>14 Dias</b>   | Área                    | 3,107 $\pm$ 2,490  | 4,251 $\pm$ 2,500 | 3,548 $\pm$ 1,240          |
|                  | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade        | 4,770 $\pm$ 2,390 | 6,226 $\pm$ 1,780          |
| <b>19 Dias</b>   | Área                    | 0,098 $\pm$ 0,037  | 1,085 $\pm$ 0,428 | 0,416 $\pm$ 0,433          |
|                  | <b>Decídua Basal</b>    | Intensidade        | 0,137 $\pm$ 0,049 | 1,533 $\pm$ 0,589          |
| <b>19 Dias</b>   | Área                    | 0,087 $\pm$ 0,056  | 1,135 $\pm$ 0,564 | 0,301 $\pm$ 0,378          |
|                  | <b>Glândula Metrial</b> | Intensidade        | 0,110 $\pm$ 0,058 | 1,620 $\pm$ 0,806          |

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

Tabela 6. Média e desvio padrão da área de detecção imunohistoquímica de IFN $\gamma$  em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de IFN $\gamma$  em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T $_4$  ao longo da gestação.

| Período e Região            |             | Controle             | Hipotireoideo       | Tratado com T $_4$  |
|-----------------------------|-------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 07 Dias<br>Decídua M e AM   | Área        | 0,068 $\pm$ 0,014 a  | 0,071 $\pm$ 0,058 a | 0,362 $\pm$ 0,228 b |
|                             | Intensidade | 0,109 $\pm$ 0,022 a  | 0,111 $\pm$ 0,090 a | 0,579 $\pm$ 0,368 b |
| 10 Dias<br>Região Lateral   | Área        | 2,695 $\pm$ 0,612 a  | 2,774 $\pm$ 0,105 a | 2,577 $\pm$ 0,269 a |
|                             | Intensidade | 2,784 $\pm$ 1,983 a  | 3,974 $\pm$ 0,065 a | 3,638 $\pm$ 0,403 a |
| 10 Dias<br>Região Central   | Área        | 2,494 $\pm$ 0,311 a  | 2,488 $\pm$ 0,243 a | 2,638 $\pm$ 0,225 a |
|                             | Intensidade | 2,764 $\pm$ 1,886 a  | 3,634 $\pm$ 0,268 a | 3,764 $\pm$ 0,280 a |
| 12 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 10,245 $\pm$ 1,139 a | 7,662 $\pm$ 0,581 b | 6,588 $\pm$ 1,056 b |
|                             | Intensidade | 12,027 $\pm$ 0,925 a | 9,767 $\pm$ 0,726 b | 8,479 $\pm$ 1,350 b |
| 12 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 7,347 $\pm$ 1,100 a  | 5,969 $\pm$ 0,440 b | 3,958 $\pm$ 0,429 c |
|                             | Intensidade | 8,734 $\pm$ 1,015 a  | 7,303 $\pm$ 0,503 b | 5,367 $\pm$ 0,576 c |
| 14 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 2,228 $\pm$ 0,180 a  | 3,082 $\pm$ 0,482 b | 3,524 $\pm$ 1,286 b |
|                             | Intensidade | 2,269 $\pm$ 1,970 a  | 4,289 $\pm$ 0,536 b | 5,854 $\pm$ 0,603 b |
| 14 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 2,110 $\pm$ 0,170 a  | 2,650 $\pm$ 0,360 b | 2,702 $\pm$ 0,652 b |
|                             | Intensidade | 2,133 $\pm$ 1,860 a  | 3,735 $\pm$ 0,412 b | 4,356 $\pm$ 0,300 b |
| 19 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 2,432 $\pm$ 0,440 a  | 2,334 $\pm$ 0,657 a | 1,911 $\pm$ 0,405 b |
|                             | Intensidade | 2,906 $\pm$ 1,530 a  | 3,400 $\pm$ 0,870 a | 2,823 $\pm$ 0,552 a |
| 19 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 2,323 $\pm$ 0,540 a  | 2,336 $\pm$ 0,670 a | 1,850 $\pm$ 0,260 b |
|                             | Intensidade | 2,786 $\pm$ 1,534 a  | 3,370 $\pm$ 0,890 a | 2,780 $\pm$ 0,370 a |

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

Tabela 7. Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de IL15 em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de IL15 em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região            |             | Controle                   | Hipotireoideo               | Tratado com T <sub>4</sub> |
|-----------------------------|-------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 07 Dias<br>Decídua M e AM   | Área        | 0,460 $\pm$ 0,042 <b>a</b> | 0,490 $\pm$ 0,060 <b>a</b>  | 1,050 $\pm$ 0,180 <b>b</b> |
|                             | Intensidade | 0,783 $\pm$ 0,070 <b>a</b> | 0,800 $\pm$ 0,100 <b>a</b>  | 1,780 $\pm$ 0,300 <b>b</b> |
| 10 Dias<br>Região Lateral   | Área        | 0,270 $\pm$ 0,059 <b>a</b> | 0,690 $\pm$ 0,200 <b>b</b>  | 0,800 $\pm$ 0,120 <b>b</b> |
|                             | Intensidade | 0,470 $\pm$ 0,099 <b>a</b> | 1,170 $\pm$ 0,340 <b>b</b>  | 1,350 $\pm$ 0,190 <b>b</b> |
| 10 Dias<br>Região Central   | Área        | 0,450 $\pm$ 0,100 <b>a</b> | 0,550 $\pm$ 0,120 <b>a</b>  | 1,070 $\pm$ 0,098 <b>b</b> |
|                             | Intensidade | 0,770 $\pm$ 0,180 <b>a</b> | 0,950 $\pm$ 0,200 <b>a</b>  | 1,800 $\pm$ 0,150 <b>b</b> |
| 12 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 4,058 $\pm$ 1,290 <b>a</b> | 7,560 $\pm$ 1,200 <b>b</b>  | 4,790 $\pm$ 1,020 <b>a</b> |
|                             | Intensidade | 6,660 $\pm$ 2,057 <b>a</b> | 11,900 $\pm$ 1,770 <b>b</b> | 7,700 $\pm$ 1,600 <b>a</b> |
| 12 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 5,330 $\pm$ 0,780 <b>a</b> | 3,010 $\pm$ 0,590 <b>b</b>  | 3,670 $\pm$ 0,950 <b>b</b> |
|                             | Intensidade | 8,370 $\pm$ 1,200 <b>a</b> | 4,700 $\pm$ 0,900 <b>b</b>  | 5,700 $\pm$ 1,450 <b>b</b> |
| 14 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 2,250 $\pm$ 0,800 <b>a</b> | 1,500 $\pm$ 0,400 <b>a</b>  | 2,027 $\pm$ 0,620 <b>a</b> |
|                             | Intensidade | 3,460 $\pm$ 1,200 <b>a</b> | 2,370 $\pm$ 0,600 <b>a</b>  | 3,110 $\pm$ 0,900 <b>a</b> |
| 14 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 0,420 $\pm$ 0,049 <b>a</b> | 0,390 $\pm$ 0,070 <b>a</b>  | 0,270 $\pm$ 0,039 <b>b</b> |
|                             | Intensidade | 0,670 $\pm$ 0,075 <b>a</b> | 0,610 $\pm$ 0,084 <b>a</b>  | 0,443 $\pm$ 0,075 <b>b</b> |
| 19 Dias<br>Decídua Basal    | Área        | 2,370 $\pm$ 0,760 <b>a</b> | 1,390 $\pm$ 0,390 <b>b</b>  | 0,360 $\pm$ 0,016 <b>c</b> |
|                             | Intensidade | 3,078 $\pm$ 0,211 <b>a</b> | 1,570 $\pm$ 1,400 <b>b</b>  | 0,600 $\pm$ 0,029 <b>c</b> |
| 19 Dias<br>Glândula Metrial | Área        | 2,420 $\pm$ 0,840 <b>a</b> | 1,800 $\pm$ 0,470 <b>a</b>  | 2,590 $\pm$ 0,800 <b>a</b> |
|                             | Intensidade | 3,580 $\pm$ 1,200 <b>a</b> | 1,860 $\pm$ 1,200 <b>a</b>  | 3,900 $\pm$ 1,20 <b>a</b>  |

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

Tabela 8. Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de iNOS em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de iNOS em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região                          |             | Controle                     | Hipotireoideo               | Tratado com T <sub>4</sub>  |
|---|-------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>07 Dias</b><br><b>Decídua M e AM</b>   | Área        | 1,980 $\pm$ 0,220 <b>a</b>   | 2,862 $\pm$ 0,900 <b>b</b>  | 1,480 $\pm$ 0,410 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 2,580 $\pm$ 0,350 <b>a</b>   | 3,460 $\pm$ 0,950 <b>b</b>  | 1,820 $\pm$ 0,560 <b>a</b>  |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Lateral</b>   | Área        | 0,232 $\pm$ 0,130 <b>a</b>   | 0,343 $\pm$ 0,180 <b>a</b>  | 0,390 $\pm$ 0,330 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 0,310 $\pm$ 0,170 <b>a</b>   | 0,460 $\pm$ 0,200 <b>a</b>  | 0,520 $\pm$ 0,400 <b>a</b>  |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Central</b>   | Área        | 0,188 $\pm$ 0,076 <b>a</b>   | 0,176 $\pm$ 0,0490 <b>a</b> | 0,690 $\pm$ 0,470 <b>b</b>  |
|   | Intensidade | 0,252 $\pm$ 0,099 <b>a</b>   | 0,240 $\pm$ 0,068 <b>a</b>  | 0,911 $\pm$ 0,610 <b>b</b>  |
| <b>12 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 29,580 $\pm$ 9,750 <b>a</b>  | 14,899 $\pm$ 4,980 <b>b</b> | 18,260 $\pm$ 4,70 <b>b</b>  |
|   | Intensidade | 32,159 $\pm$ 10,090 <b>a</b> | 16,789 $\pm$ 5,320 <b>b</b> | 21,930 $\pm$ 5,140 <b>b</b> |
| <b>12 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 19,555 $\pm$ 3,700 <b>a</b>  | 13,227 $\pm$ 4,900 <b>b</b> | 19,689 $\pm$ 4,188 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 21,940 $\pm$ 4,229 <b>a</b>  | 15,710 $\pm$ 5,800 <b>b</b> | 23,850 $\pm$ 5,090 <b>a</b> |
| <b>14 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 0,660 $\pm$ 0,630 <b>a</b>   | 0,578 $\pm$ 0,470 <b>a</b>  | 0,710 $\pm$ 0,420 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 0,800 $\pm$ 0,700 <b>a</b>   | 0,708 $\pm$ 0,567 <b>a</b>  | 0,850 $\pm$ 0,490 <b>a</b>  |
| <b>14 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 0,920 $\pm$ 0,600 <b>a</b>   | 0,296 $\pm$ 0,240 <b>b</b>  | 0,754 $\pm$ 0,440 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 1,120 $\pm$ 0,630 <b>a</b>   | 0,380 $\pm$ 0,300 <b>b</b>  | 0,945 $\pm$ 0,500 <b>a</b>  |
| <b>19 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 0,780 $\pm$ 0,490 <b>a</b>   | 0,770 $\pm$ 0,250 <b>a</b>  | 0,980 $\pm$ 0,240 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 0,856 $\pm$ 0,200 <b>a</b>   | 1,180 $\pm$ 0,300 <b>a</b>  | 0,935 $\pm$ 0,500 <b>a</b>  |
| <b>19 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 0,460 $\pm$ 0,400 <b>a</b>   | 0,320 $\pm$ 0,095 <b>b</b>  | 0,500 $\pm$ 0,280 <b>a</b>  |
|   | Intensidade | 0,550 $\pm$ 0,400 <b>a</b>   | 0,390 $\pm$ 0,110 <b>b</b>  | 0,628 $\pm$ 0,340 <b>a</b>  |

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

Tabela 9. Média e desvio padrão da área de detecção imunohistoquímica de MIF em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de MIF em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

| Período e Região                          |             | Controle              | Hipotireoideo          | Tratado com T <sub>4</sub> |
|---|-------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| <b>07 Dias</b><br><b>Decídua M e AM</b>   | Área        | 4,025 ±1,450 <b>a</b> | 3,031 ±0,127 <b>b</b>  | 5,646 ±0,335 <b>c</b>      |
|   | Intensidade | 5,360 ±1,555 <b>a</b> | 4,328 ± 0,183 <b>b</b> | 8,034 ±0,639 <b>c</b>      |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Lateral</b>   | Área        | 1,179±0,922 <b>a</b>  | 6,107±0,152 <b>b</b>   | 4,185±1,540 <b>c</b>       |
|   | Intensidade | 1,668 ±1,440 <b>a</b> | 8,384 ±0,450 <b>b</b>  | 3,524 ±3,514 <b>a</b>      |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Central</b>   | Área        | 1,076±0,310 <b>a</b>  | 6,572±1,135 <b>b</b>   | 3,474±0,997 <b>c</b>       |
|   | Intensidade | 1,645 ±0,488 <b>a</b> | 9,678 ±1,584 <b>b</b>  | 5,306 ±1,476 <b>c</b>      |
| <b>12 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 2,202±0,746 <b>a</b>  | 5,135±1,250 <b>b</b>   | 1,114±0,114 <b>c</b>       |
|   | Intensidade | 3,273 ±1,059 <b>a</b> | 7,580 ±1,800 <b>b</b>  | 1,680 ±0,158 <b>c</b>      |
| <b>12 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 1,260±0,360 <b>a</b>  | 1,750±0,422 <b>ab</b>  | 2,680±1,0470 <b>b</b>      |
|   | Intensidade | 1,403 ±1,070 <b>a</b> | 2,550 ±0,611 <b>ab</b> | 3,900 ±1,460 <b>b</b>      |
| <b>14 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 1,482 ±0,890 <b>a</b> | 3,510±1,370 <b>b</b>   | 3,750±1,510 <b>b</b>       |
|   | Intensidade | 1,613 ±1,500 <b>a</b> | 5,356 ±2,080 <b>b</b>  | 5,770 ±2,220 <b>b</b>      |
| <b>14 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 4,797±1,830 <b>a</b>  | 3,790±0,890 <b>b</b>   | 2,620±1,340 <b>ab</b>      |
|   | Intensidade | 3,100 ±2,500 <b>a</b> | 7,110 ±2,640 <b>b</b>  | 5,660 ±1,200 <b>ab</b>     |
| <b>19 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 0,850±0,598 <b>a</b>  | 0,560±0,360 <b>a</b>   | 0,670±0,610 <b>a</b>       |
|   | Intensidade | 0,809 ±0,770 <b>a</b> | 0,858 ±0,500 <b>a</b>  | 1,002 ±0,890 <b>a</b>      |
| <b>19 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 1,620±0,540 <b>a</b>  | 1,730±0,920 <b>a</b>   | 1,500±0,566 <b>a</b>       |
|   | Intensidade | 3,109 ±2,400 <b>a</b> | 1,900 ±1,700 <b>a</b>  | 3,235 ±2,280 <b>a</b>      |

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



Tabela 10. Média e desvio padrão da área de detecção imunoistoquímica de Lectina DBA em pixels ( $\times 10^5$ ) e densidade integrada de Lectina DBA em pixels ( $\times 10^7$ ) na região de decídua e glândula metrial das ratas gestantes dos grupos controle, hipotireoideo e tratado com T<sub>4</sub> ao longo da gestação.

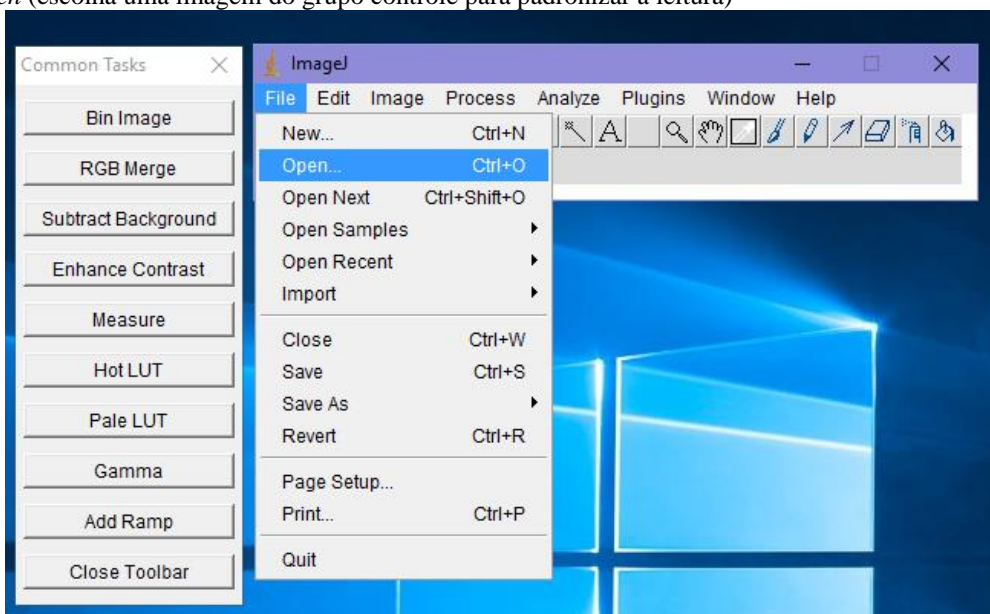
| Período e Região                          |             | Controle                   | Hipotireoideo              | Tratado com T <sub>4</sub> |
|---|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>07 Dias</b><br><b>Decídua M e AM</b>   | Área        | 2,500 $\pm$ 0,250 <b>a</b> | 0,360 $\pm$ 0,100 <b>b</b> | 1,720 $\pm$ 0,548 <b>c</b> |
|   | Intensidade | 3,140 $\pm$ 0,340 <b>a</b> | 0,469 $\pm$ 0,130 <b>b</b> | 2,220 $\pm$ 0,670 <b>c</b> |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Lateral</b>   | Área        | 1,898 $\pm$ 0,660 <b>a</b> | 1,150 $\pm$ 0,084 <b>a</b> | 1,490 $\pm$ 0,640 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 2,360 $\pm$ 0,780 <b>a</b> | 1,450 $\pm$ 0,130 <b>a</b> | 1,800 $\pm$ 0,750 <b>a</b> |
| <b>10 Dias</b><br><b>Região Central</b>   | Área        | 3,550 $\pm$ 0,033 <b>a</b> | 2,200 $\pm$ 0,200 <b>b</b> | 2,040 $\pm$ 0,945 <b>b</b> |
|   | Intensidade | 4,300 $\pm$ 0,084 <b>a</b> | 2,80 $\pm$ 0,230 <b>b</b>  | 2,500 $\pm$ 1,100 <b>b</b> |
| <b>10 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 2,440 $\pm$ 0,880 <b>a</b> | 0,900 $\pm$ 0,460 <b>b</b> | 0,790 $\pm$ 0,180 <b>b</b> |
|   | Intensidade | 2,110 $\pm$ 0,311 <b>a</b> | 0,910 $\pm$ 0,46 <b>b</b>  | 0,794 $\pm$ 0,181 <b>b</b> |
| <b>12 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 0,500 $\pm$ 0,090 <b>a</b> | 0,580 $\pm$ 0,080 <b>a</b> | 0,860 $\pm$ 0,300 <b>b</b> |
|   | Intensidade | 0,630 $\pm$ 0,110 <b>a</b> | 0,740 $\pm$ 0,100 <b>a</b> | 1,090 $\pm$ 0,400 <b>b</b> |
| <b>12 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 0,550 $\pm$ 0,130 <b>a</b> | 0,710 $\pm$ 0,140 <b>a</b> | 1,700 $\pm$ 0,340 <b>b</b> |
|   | Intensidade | 0,660 $\pm$ 0,150 <b>a</b> | 0,870 $\pm$ 0,180 <b>a</b> | 2,020 $\pm$ 0,350 <b>b</b> |
| <b>14 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 1,390 $\pm$ 0,290 <b>a</b> | 0,570 $\pm$ 0,190 <b>b</b> | 1,430 $\pm$ 0,120 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 1,750 $\pm$ 0,340 <b>a</b> | 0,730 $\pm$ 0,250 <b>b</b> | 1,800 $\pm$ 0,120 <b>a</b> |
| <b>14 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 1,400 $\pm$ 0,320 <b>a</b> | 1,390 $\pm$ 0,280 <b>a</b> | 1,480 $\pm$ 0,220 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 1,780 $\pm$ 0,400 <b>a</b> | 1,740 $\pm$ 0,350 <b>a</b> | 1,870 $\pm$ 0,270 <b>a</b> |
| <b>19 Dias</b><br><b>Decídua Basal</b>    | Área        | 1,432 $\pm$ 0,440 <b>a</b> | 1,334 $\pm$ 0,357 <b>a</b> | 1,011 $\pm$ 0,405 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 1,906 $\pm$ 0,750 <b>a</b> | 2,400 $\pm$ 0,870 <b>a</b> | 1,823 $\pm$ 0,550 <b>a</b> |
| <b>19 Dias</b><br><b>Glândula Metrial</b> | Área        | 1,323 $\pm$ 0,540 <b>a</b> | 1,336 $\pm$ 0,370 <b>a</b> | 1,050 $\pm$ 0,260 <b>a</b> |
|   | Intensidade | 1,786 $\pm$ 0,730 <b>a</b> | 2,370 $\pm$ 0,880 <b>a</b> | 1,780 $\pm$ 0,370 <b>a</b> |

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

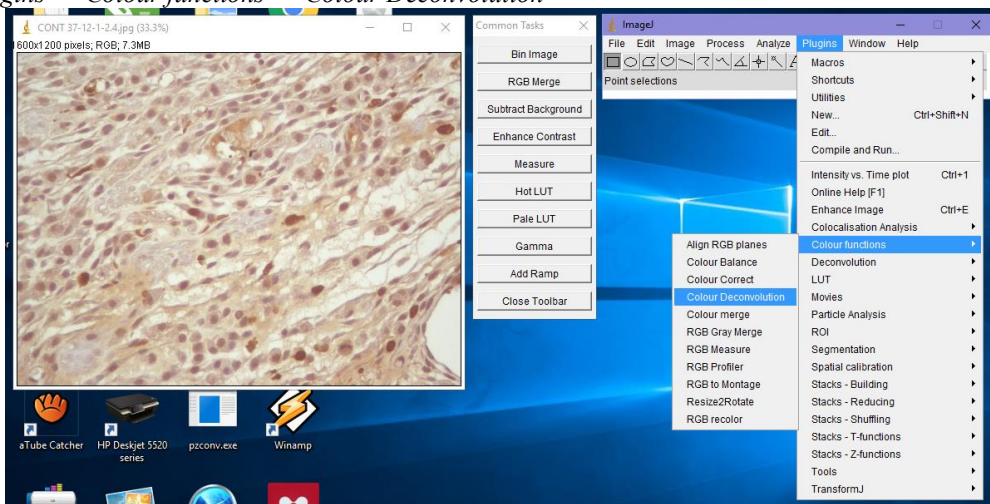
## ANEXO 4

### PROTOCOLO DA ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA IMUNOISTOQUÍMICA PELO PROGRAMA WCIF ImageJ

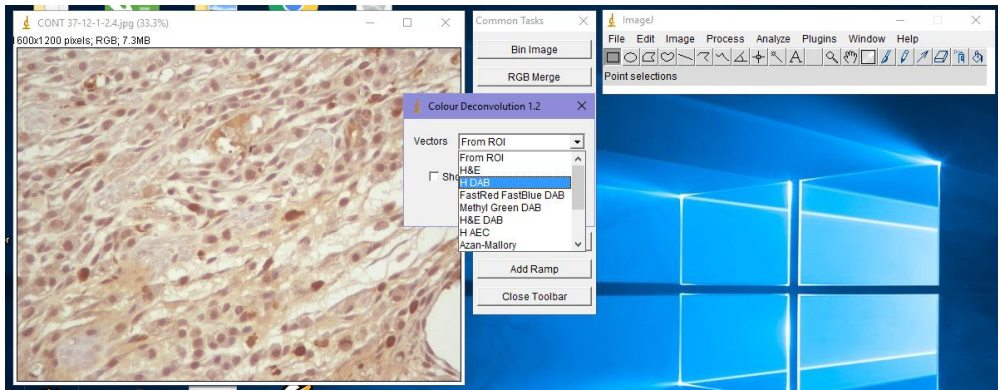
1. Abrir o programa WCIF ImageJ
2. *File*
3. *Open* (escolha uma imagem do grupo controle para padronizar a leitura)



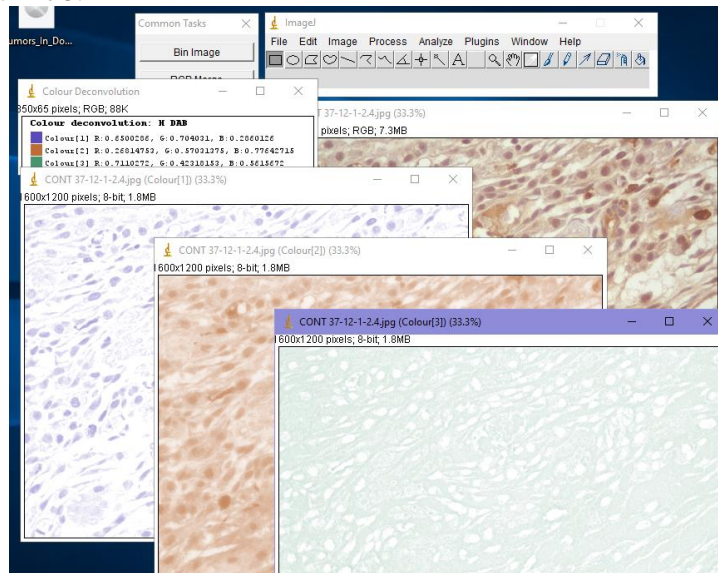
4. *Plugins* → *Colour functions* → *Colour Deconvolution*



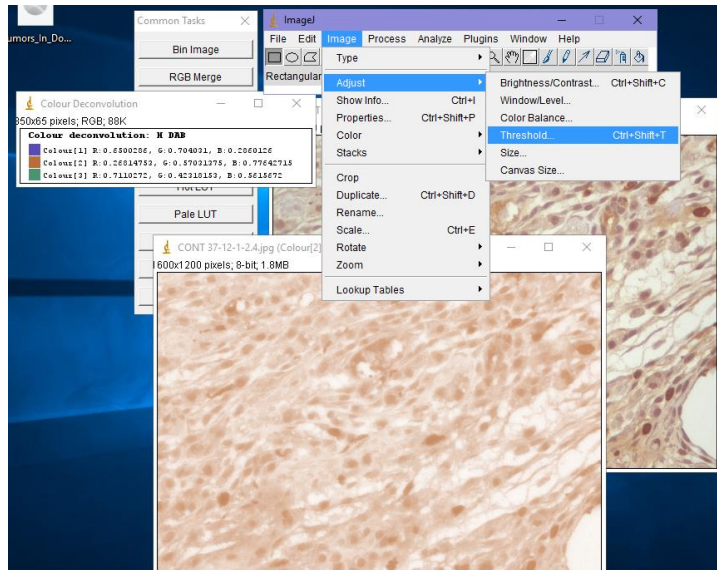
5. Escolher "DAB H"



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

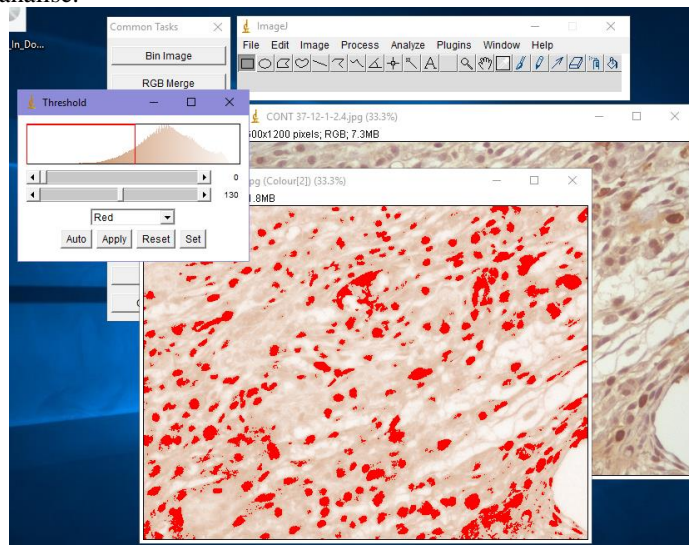


7. *Image* → *Adjust* → *Threshold*



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

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

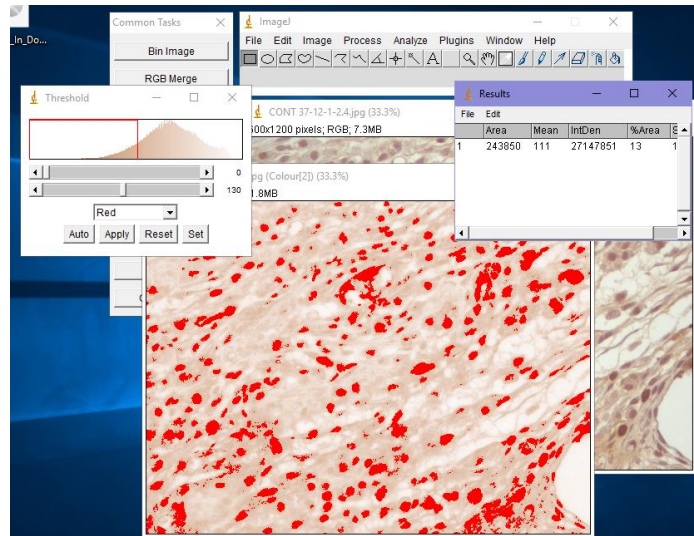


9. *Apply* → *Cancel*

10. *Analyze* → *Set Measurements*

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

12. *Ctrl + M*



13. O resultado pode ser salvo e/ou copiado para o programa Excel.
14. Escolha a próxima imagem e repita a análise.

## ANEXO 5

### PROTOCOLO DA IMUNOISTOQUÍMICA

#### **Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase**

- Xilol 1 (30 min)
- Xilol 2 (30 min)
- Álcool absoluto 1 (5 min)
- Álcool absoluto 2 (5 min)
- Álcool absoluto 3 (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)
- Banho Maria a 98oC (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

- 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 dH<sub>2</sub>O (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 H<sub>2</sub>O

## ANEXO 6

### EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL COM TRIZOL (TECIDO):

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

#### **Diluição para dosar:**

Utilizar o eppendorfe de 600 µL.

Colocar 98 µl de água DEPC + 2 µl do RNA

#### **Leitura no espectofotômetro:**

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

RNA

DILUIÇÃO

BLANK→ 100µl água DEPC

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

## ANEXO 7

### SÍNTESE DO cDNA:

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

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

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

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

$$\begin{array}{r} 400 \mu\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \mu\text{L} \\ 1 \mu\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad x \\ x = 2,5 \mu\text{L de RNA} \end{array}$$

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

3. Preparar o Master MIX :

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

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

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

- *programação A:*

25°C por 10 minutos

42°C por 50 minutos

85°C por 5 minutos

Hold – 4°C

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

- *programação B:*

37°C por 20 minutos

Hold – 4°C

6. Estocar o cDNA a -20°C



## ANEXO 8

### RT-PCR TEMPO REAL:

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

| MIX                   | 1x                 | Ex.: 6x          |
|-----------------------|--------------------|------------------|
| <i>SYBR Green</i>     | 12,5 $\mu\text{L}$ | 75 $\mu\text{L}$ |
| <i>Primer forward</i> | 1 $\mu\text{L}$    | 6 $\mu\text{L}$  |
| <i>Primer reverse</i> | 1 $\mu\text{L}$    | 6 $\mu\text{L}$  |
| <i>Rox</i>            | 1 $\mu\text{L}$    | 6 $\mu\text{L}$  |
| cDNA                  | 2,5 $\mu\text{L}$  | -----            |
| Água DEPC             | 7,0 $\mu\text{L}$  | 42 $\mu\text{L}$ |

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

Diluição do Rox: 1  $\mu\text{L}$  do Rox concentrado para 9  $\mu\text{L}$  de água DEPC

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

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

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

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