

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E MORFOMETRIA DO ÚTERO E DA
PLACENTA DE RATAS HIPERTIREÓIDEAS NA GESTAÇÃO E NO PÓS-
PARTO ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO FETAL**

EDMILSON SANTOS DE FREITAS

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2006**

Edmilson Santos de Freitas

**PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E MORFOMETRIA DO ÚTERO E DA PLACENTA
DE RATAS HIPERTIREÓIDEAS NA GESTAÇÃO E NO PÓS-PARTO ASSOCIADAS
AO DESENVOLVIMENTO FETAL**

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

Área: Patologia animal

Orientador: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2006

F866p

Freitas, Edmilson Santos de, 1976-

Proliferação, apoptose e morfometria do útero e da placenta de ratas hipertireóideas na gestação e no pós-parto associadas ao desenvolvimento fetal / Edmilson Santos de Freitas. - 2006.

71 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides

Co-orientador: Geovanni Dantas Cassali

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

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Rato – Reprodução – Teses.
3. Hipertireoidismo – Teses. 4. Apoptose – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Cassali, Geovanni Dantas. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.088 5

Dissertação defendida e aprovada em 23 de fevereiro de 2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Rogéria Serakides
Orientadora

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Co-orientador

Prof. Dr. Ernane Fagundes do Nascimento

Prof. Dr. José Carlos Nogueira

Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Valle

**Aos meus pais, Josias e Marivalda
e irmã Luciana, com muito amor**

AGRADECIMENTOS

A Deus, o proporcionador de tudo isso...

À Profa. Rogéria Serakides pela orientação, ensinamentos e também pela paciência que teve comigo durante todo esse tempo. Agradeço por acreditar em mim!

Ao Prof. Geovanni Dantas Cassali por disponibilizar o Laboratório de Patologia Comparada nas eternas manhãs e tardes que passamos fazendo imunoistoquímica... Também quero agradecer pela atenção e paciência. Aprendi muito durante esse tempo!!!

Aos professores da Patologia Veterinária da UFMG, pelos ensinamentos que me foram passados durante todo esse tempo que estive aqui. Agradeço, em especial, aos profs Renato de Lima Santos e Roberto Guedes pelas longas horas de conversa que tivemos...

À minha companheira de experimento (irmã) Eveline, que dividiu comigo essa grande tarefa. Agradeço pela atenção, carinho e amizade eterna! Momentos bons que passamos...

À família Viana (Clélio, Lenilda, Priscila, Eliézer e Israel), em especial minha namorada Sâmela pelo carinho, apoio e incentivo.

Às técnicas do laboratório de histopatologia, Marilene, minha “maezona”, pelo carinho, quebra-galhos, atenção e preocupação que teve comigo durante todo esse tempo. Nunca esquecerei... A Mel, pela atenção e paciência que teve comigo!

Às meninas do setor de patologia, Silvia, Natália, Tatiane, Alcina, Patrícia, Nádia, Núbia, Fabiana, Cristiane, Lauana e Carol. Também não poderia esquecer da Taismara.

A todo o pessoal do laboratório de patologia comparada do ICB, em especial ao Ênio e a Mariana. Momentos felizes!!!

Aos meus grandes amigos Carlos e Gil pelo companheirismo e que souberam me aturar quando estava com saudade da família.

Aos meus novos e inesquecíveis amigos Ramifrançis, Adriana, Daniele (Fina), Juliana, Daniele e Gustavo pelos grandes momentos de descontração! Dias inesquecíveis...

A Wanessa pela sua contribuição na tradução do resumo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos e à PRPq/UFMG pelo auxílio financeiro destinado ao projeto.

**“O empreendimento de uma nova ação
traz uma nova força”**
Evenius

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Morfofisiologia uterina.....	18
2.1.1 Endométrio.....	18
2.1.2 Miométrio.....	19
2.1.3 Perimétrio.....	19
2.2 Fertilização e desenvolvimento do blastocisto.....	20
2.3 Implantação embrionária.....	21
2.4 Decidualização.....	24
2.5 Diferenciação trofoblástica.....	25
2.6 Proliferação e apoptose durante a gestação.....	26
2.7 Efeito dos hormônios sexuais e tireoidianos no trato reprodutivo feminino.....	26
2.8 Involução uterina.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Experimento 1	29
3.2. Experimento 2	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Experimento 1	33
4.1.1. Indução ao hipertireoidismo.....	33
4.1.2. Peso dos animais gestantes.....	34
4.1.3. Histomorfometria ovariana.....	35

4.1.4. Número total e características fetais.....	37
4.1.5. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do útero.....	39
4.1.6. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do trofoblasto.....	42
4.1.7. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do disco placentário.....	42
4.2. Experimento 2.....	49
4.2.1. Indução ao hipertireoidismo.....	49
4.2.2. Histomorfometria ovariana.....	51
4.2.3. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do útero em involução.....	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Altura média do epitélio folicular gestação (Média \pm Desvio-padrão) das tireóides (μm) das ratas tratadas ou não com tiroxina aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	34
Tabela 2. Consumo diário de água e ração gestação (Média \pm Desvio-padrão) das ratas tratadas ou não tratadas com tiroxina durante a indução e gestação.....	34
Tabela 3. Peso dos animais (Média \pm Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	35
Tabela 4. Número total e porcentagem de fetos viáveis (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo.....	38
Tabela 5. Peso uterino (g) (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	39
Tabela 6. Diâmetro nuclear médio das células trofoblásticas e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete dias de gestação.....	42
Tabela 7. Diâmetro médio do disco placentário (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	44
Tabela 8. Espessura do labirinto placentário e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	44
Tabela 9. Espessura do espongiotrofoblasto e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	48
Tabela 10. Altura média do epitélio folicular das tireóides (Média \pm Desvio-padrão) em ratas tratadas com tiroxina e não tratadas no segundo dia após o parto.....	50
Tabela 11. Peso médio dos ovários (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto.....	51
Tabela 12 Diâmetro dos sítios de inserção placentária e peso uterino (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto.....	51
Tabela 13. Espessura endometrial e número de células/campo com expressão de CDC-47 e caspase-3 (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto.....	53
Tabela 14. Espessura miometrial e número de células/campo com expressão de CDC-47 e caspase-3 (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Peso ovariano (Média ± Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	35
Gráfico 2. Número de corpos lúteos e folículos nos ovários (Média ± Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete dias de gestação.....	36
Gráfico 3. Peso individual dos fetos (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	38
Gráfico 4. Espessura das camadas uterinas (μm) (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	40
Gráfico 5. Número de células/campo com expressão de CDC-47 nas camadas uterinas (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	41
Gráfico 6. Número de células/campo com expressão de caspase-3 nas camadas uterinas (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.....	41
Gráfico 7. Espessura da camada de células gigantes trofoblásticas e do número de células/campo com expressão de caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.....	48
Gráfico 8. Concentração plasmática de T4 ($\mu\text{g/dl}$) (Média ± Desvio-padrão) em ratas tratadas com tiroxina e não tratadas no segundo dia após o parto.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rata gestante (grupo controle). Abertura do útero (U) para remoção do feto (F) com preservação da parede uterina e do disco placentário (D) <i>in situ</i>	30
Figura 2. Ovários, rata com sete dias de gestação. HE, 9,1 × A) Grupo controle. B) Grupo hipertireóideo. Ovário com maior número de corpos lúteos (CL) nas ratas hipertireóideas em comparação ao ovário das ratas do grupo controle.....	37
Figura 3A. Trofoblasto, rata com sete dias de gestação. Grupo controle. HE, 260×. Figura 3B) Trofoblasto, rata com sete dias de gestação. Grupo hipertireóideo. HE, 257,1×. Células trofoblásticas com núcleo vesiculoso, mais volumoso em comparação às células trofoblásticas das ratas eutireóideas e com citoplasma grumoso. Figura 3C) Imunomarcção para CDC-47, Grupo eutireóideo. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 102,86×. Figura 3D) Imunomarcção para CDC-47, Grupo hipertireóideo com imunomarcção semelhante ao eutireóideo. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 102,86×. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em	45

marrom.....

Figura 4. Rata, grupo controle, disco placentário, 19 dias de gestação. HE. A) Corte transversal do disco placentário com espongiotrofoblasto (C), labirinto placentário (L), decídua (D) e útero (U). 8,9x. B) Detalhe das camadas de células gigantes trofoblásticas (S), espongiotrofoblasto (C) e labirinto placentário (L). 28,57x. C) labirinto com finos capilares fetais sustentados por pequena quantidade de tecido conjuntivo e rodeados por células trofoblásticas alongadas ou ovóides. 194,29x. D) Camada de células citotrofoblásticas constituída por células bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com citoplasma escasso. 194,29x. E) Camada de células gigantes trofoblásticas delgada e composta por células fundidas que compartilhavam o mesmo citoplasma, ora eosinofílico ora basofílico, formando uma massa plasmodial.....

46

Figura 5. Rata, disco placentário, 14 dias de gestação. A e B) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto mais espessa no grupo hipertireóideo. HE, 20x. C e D) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Maior expressão de CDC-47 nas células citotrofoblásticas do grupo hipertireóideo em comparação ao eutireóideo. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 72x. S: células gigantes trofoblásticas, C: espongiotrofoblasto e L: labirinto placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom.....

47

Figura 6. Rata, disco placentário, 14 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 114,28x. A e B) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Camada de células gigantes trofoblásticas com células sem expressão de CDC-47 em ambos os grupos (setas).....

49

Figura 7. Rata, dois dias pós-parto, sítio de inserção placentária. HE, 11,54x. A e B) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Sítio de inserção placentária no grupo controle com diâmetro aparentemente maior quando comparado ao grupo hipertireóideo e com áreas de hemorragia e formações de trombos (T).....

54

Figura 8. Rata, dois dias pós-parto, útero em involução. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 88x. A e B) Grupo controle. Endométrio e miométrio, respectivamente com poucas células com expressão de CDC-47. C e D) Grupo hipertireóideo. Endométrio e miométrio, respectivamente com muitas células com expressão de CDC-47. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom.....

55

Figura 9. Rata, dois dias pós-parto, útero em involução. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 88x. A, B e C) Grupo controle. Endométrio e miométrio, respectivamente com muitas células com expressão de caspase-3. D, E e F) Grupo hipertireóideo. Endométrio e miométrio, respectivamente com pequeno número de células com expressão de caspase-3. As células imunomarcadas pela caspase-3 apresentam núcleo e/ou citoplasma corados em marrom.....

56

RESUMO

Em dois experimentos distintos, foi avaliado o efeito do hipertireoidismo na taxa de proliferação, apoptose e na morfometria do útero e da placenta durante a gestação e após o parto, bem como o desenvolvimento fetal. No experimento 1, foram utilizadas 36 ratas Wistar adultas distribuídas em dois grupos de 18 animais: hipertireóideo e eutireóideo (controle). As ratas foram acasaladas e após sete, 14 e 19 dias de gestação, seis animais/grupo foram sacrificados. O útero juntamente com a placenta foi pesado e submetido à avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica para a determinação da taxa de proliferação celular e de apoptose com o uso dos anticorpos anti-CDC-47 e anti-caspase-3, respectivamente. Os fetos foram quantificados e pesados individualmente. No experimento 2, foram utilizadas 12 ratas Wistar adultas distribuídas em dois grupos de seis animais: hipertireóideo e eutireóideo (controle). As ratas foram acasaladas e dois dias após o parto foram sacrificadas. O útero foi avaliado de forma semelhante ao experimento 1. Os ovários das ratas de ambos os experimentos foram avaliados. O hipertireoidismo aumentou a taxa de ovulação e de concepção sem alterar a viabilidade e o tamanho dos fetos. No útero gestante, o hipertireoidismo não alterou a espessura das suas camadas e a taxa de proliferação e de apoptose. No entanto, na placenta, o hipertireoidismo aumentou o diâmetro médio das células trofoblásticas e aumentou a espessura e a taxa de proliferação da camada de espongiotrofoblasto aos 14 dias de gestação. Durante a involução uterina, o hipertireoidismo aumentou significativamente a taxa de proliferação e reduziu a taxa de apoptose das camadas uterinas. Conclui-se que o hipertireoidismo aumenta a taxa de concepção, por aumentar a taxa de ovulação e por induzir alterações placentárias significativas durante a gestação e aumenta a taxa de proliferação e reduz a taxa de apoptose das camadas uterinas após o parto.

Palavras chave: hipertireoidismo, útero, placenta, gestação, pós-parto, rata Wistar.

ABSTRACT

In two different experiments, the hyperthyroidism effect was evaluated on the proliferation rate, apoptosis and morphometry of uterus and placenta during gestation, fetal development and after birth. In the first experiment, 36 sexually mature female Wistar rats were distributed in two groups of 18 animals: hyperthyroid and euthyroid (control). The female rats were mated and after seven, 14 and 19 days of gestation, six animals/group were sacrificed. The uterus and the placenta were weighed and submitted to histomorphometric and immunohistochemical evaluation to determine the cellular proliferation rate and apoptosis, using the antibodies anti-CDC-47 and anti-caspase-3, respectively. The fetuses were quantified and weighed individually. In the second experiment, 12 sexually mature female Wistar rats were distributed in two groups of six animals: hyperthyroid and euthyroid (control). The female rats were mated and sacrificed after two days pos-parturition. The uteri were evaluated on the same way as the first experiment. The rats' ovaries were evaluated in both experiments. The hyperthyroidism has increased the ovulation and conception rates without disturbing the size and viability of the fetuses. In the pregnant uterus, the hyperthyroidism did not change the layers' thickness, proliferation rate or apoptosis. However, on the placenta, the hyperthyroidism increased the medium diameter of the trophoblastic cells and also the thickness and proliferation rate of the cytotrophoblast at 14 days of gestation. During the uterine involution, the hyperthyroidism raised the proliferation rate significantly and reduced the apoptosis rate of the uterine layers. In conclusion, the hyperthyroidism increases the conception rate because of the ovulation gain and induces significant placental changes during pregnancy and increases the proliferation rate and reduces the apoptosis rate of the uterine layers two days pos-parturition.

Key-words: hyperthyroidism, uterus, placenta, gestation, pos-partum, rat Wistar

1. INTRODUÇÃO

Durante a gestação, o útero sofre uma série de modificações que resultam numa extensa reorganização tecidual cuja principal finalidade é acomodar o concepto (Correia-da-Silva et al., 2004). Em ratos e camundongos, o útero responde aos estímulos advindos do blastocisto que conferem mudanças tanto no seu epitélio quanto no estroma, promovendo a implantação e formação da decídua (Weitlauf, 1994; Joswig et al., 2003).

A implantação do embrião se inicia com a aposição do blastocisto e com a adesão do trofoblasto ao epitélio uterino receptivo (Guillomot et al., 1993; Weitluf, 1994; Joswig et al., 2003). Por sua vez, o endométrio uterino responde à implantação do blastocisto com extensa proliferação e diferenciação das células decíduais, formando as decíduas antimesometrial e mesometrial, que sofrem regressão por apoptose. Existe comprovação de que o equilíbrio entre as taxas de proliferação e morte celular é essencial para o sucesso da implantação e manutenção do embrião durante todo o período gestacional e que o aumento da taxa de apoptose das células decíduais aumenta significativamente os casos de aborto espontâneo em humanos (Kokawa et al., 1998).

As disfunções tireoidianas modificam a morfofisiologia do sistema genital de fêmeas não gestantes por mecanismos ainda não totalmente elucidados. O hipotireoidismo diminui o volume absoluto do endométrio e a camada muscular do útero de ratas (Inuwa e Williams, 1996; Silva et al., 2004). Isso leva à hipótese de que essas mudanças causem dificuldades de concepção e manutenção da gestação, no hipotireoidismo. Os hormônios tireoidianos

parecem agir no útero regulando a responsividade do órgão ao estrógeno (Gardner et al., 1978). Assim, no hipotireoidismo há redução da resposta de células uterinas ao estrógeno, diminuindo a proliferação de células epiteliais, estromais e miometriais (Kirkland et al., 1981).

Já no hipertireoidismo, há estímulo da foliculogênese ovariana e diminuição da atresia folicular em ratas púberes (Serakides et al., 2001). Recentemente foi observado que o hipertireoidismo induz modificações significativas no útero de ratas pré-púberes, e que após a maturidade sexual as modificações ocorrem tanto no útero quanto na tuba uterina em intensidade variável e dependente da fase do ciclo estral (Oliveira et al., 2005). Esses achados indicam que tais mudanças no útero e na tuba uterina de ratas hipertireóideas não gestantes podem dar maior suporte ao incremento da foliculogênese com aumento da taxa de gestação, já que foi relatado, também, que ratas gestantes hipertireóideas parem maior número de filhotes (Rosato et al., 1992).

Apesar de o hipertireoidismo ser uma das endocrinopatias mais frequentes na mulher e de haver vários estudos sobre seu efeito em todo o organismo (Carneiro et al., 2000; Serakides, 2000a; Serakides, 2000b; Serakides, 2001; Franklin, 2003; Ocarino et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Serakides, 2005), há total carência de informações no que diz respeito às modificações que ocorrem no útero e na placenta de fêmeas gestantes com hipertireoidismo. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a taxa de proliferação e apoptose celular e a histomorfometria do útero e da placenta de ratas hipertireóideas durante a gestação e no pós-parto, bem como avaliar o desenvolvimento fetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Morfofisiologia uterina

O útero é o órgão do sistema genital feminino que desempenha funções essenciais à reprodução nas diferentes espécies de mamíferos. É capaz de sofrer modificações durante o ciclo estral e na gestação aumenta seu volume significativamente, retornando ao tamanho normal no pós-parto. Durante a gestação, o útero é responsável pela implantação, acomodação e desenvolvimento embrionário e fetal (Hafez, 1993). É dividido, na maioria dos mamíferos, em cornos bilaterais ligados às tubas uterinas, em corpo e um colo ou cérvix, que se unem à vagina (Maximow e Bloom, 1957). Sua parede, histologicamente, é constituída por três camadas: mucosa ou endométrio, muscular ou miométrio e serosa ou perimétrio (Maximow e Bloom, 1957; Junqueira e Carneiro, 1995).

2.1.1 Endométrio

O epitélio de revestimento do endométrio é colunar simples, porém áreas de epitélio pseudoestratificado colunar podem ocorrer na porca e nos ruminantes assim como focos isolados de epitélio cuboidal (Banks, 1993). Além de revestir, o epitélio também secreta, juntamente com as glândulas endometriais, muco e lípidos. O endométrio apresenta a camada superficial da lâmina própria constituída por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado com inúmeros fibroblastos, macrófagos e mastócitos. A partir do sangue, heterófilos, eosinófilos, linfócitos e células plasmáticas penetram à lâmina própria (Junqueira & Carneiro, 1995). Ainda é constituído da camada profunda da lâmina própria que consiste em um tecido conjuntivo frouxo e bem menos celularizado quando comparado à camada superficial (Maximow e Bloom, 1957; Banks, 1993; Junqueira e Carneiro, 1995).

Sob a ação endócrina dos ovários, produzida por estímulo da adeno-hipófise, o endométrio sofre modificações estruturais cíclicas e funcionais (Maximow e Bloom, 1957; Junqueira & Carneiro, 1995). As modificações cíclicas endometriais são diferentes nas várias espécies, inclusive nas ratas, em decorrência de diferentes características dos ciclos estrais. O ciclo estral, por sua vez, geralmente é dividido em cinco distintos, porém contínuos estágios (Banks, 1993; Hafez, 1993; Freeman, 1994, Ojeda e Urbanski, 1994):

O proestro compreende o período de maturação folicular sobre a influência do FSH. Os folículos começam a secretar estrógeno, que é responsável pelas modificações nos órgãos genitais, o que leva, desta forma, ao desenvolvimento uterino. O revestimento epitelial hipertrofia, porém as glândulas endometriais permanecem retilíneas. A vascularização e congestão aumentam e também pode ocorrer hemorragia. Nesta fase, o aumento dos níveis de estrógeno se sobrepõe aos níveis de progesterona (Banks, 1993; Hafez, 1993; Freeman, 1994; Ojeda e Urbanski, 1994).

O estro é marcado pela completa influência do estrógeno sobre os órgãos genitais. A proliferação epitelial e glandular continua e torna-se mais evidente enquanto a atividade secretora celular aumenta. Há congestão, edema e hemorragia. Esse é o período de receptividade sexual por parte das fêmeas e é nele que ocorre a ovulação (Banks, 1993; Hafez, 1993; Freeman, 1994; Ojeda e Urbanski, 1994).

O metaestro é o estágio transicional em que há declínio dos níveis de estrógeno contrabalanceado pelo aumento dos níveis de progesterona, devido ao desenvolvimento do corpo lúteo. A hiperplasia glandular continua e ocorre elevada atividade secretora, enquanto o edema tecidual diminui ou até mesmo desaparece (Banks,

1993; Hafez,1993; Freeman, 1994; Ojeda e Urbanski, 1994).

O diestro é o período do ciclo estral onde existe influência predominante de progesterona. Observa-se marcada hiperplasia glandular e, se ocorrer fertilização, a máxima atividade secretora é mantida. Porém, se não houver fertilização, a vascularização diminui, a atividade secretora cessa e o revestimento celular e glandular involui. A fertilização do ovócito e subsequente gestação resultam no prolongamento do diestro, assim como em situações de pseudogravidez ou no anestro lactacional (Banks, 1993; Hafez,1993; Freeman, 1994; Ojeda e Urbanski, 1994).

E por fim, o anestro é o período prolongado de inatividade sexual. O endométrio encontra-se delgado e revestido por epitélio simples cuboidal. As glândulas uterinas são espaçadas, assumindo a forma simples ou tubular ramificada (Banks, 1993; Hafez,1993; Freeman, 1994; Ojeda e Urbanski, 1994).

Durante o proestro e o estro, grandes folículos ovarianos produzem estrógeno, enquanto que durante o metaestro e o diestro o corpo lúteo produz progesterona. Desta forma, tanto o efeito estrogênico quanto o progesterônico são, em grande parte, responsáveis pelas modificações cíclicas do endométrio. O ciclo menstrual dos primatas possui duas fases: folicular e luteal. A fase folicular, ou fase proliferativa, inclui os eventos que ocorrem durante o proestro e o estro; enquanto a fase luteal, também chamada de fase progestacional ou fase secretória, diz respeito aos eventos similares àqueles do metaestro e do diestro (Maximow e Bloom, 1957; Burkit et al., 1994; Junqueira e Carneiro, 1995).

Os estágios do ciclo estral são variáveis entre as espécies domésticas, porém os animais podem ser classificados como monoestrais ou poliestrais. Alguns animais,

como por exemplo a cadela e a gata, são monoéstricos e possuem um ou dois ciclos estrais por ano, seguido por um período prolongado de anestro. Já os animais com ciclos contínuos, sem um período de anestro, tais como a vaca, a porca e os roedores, ou os animais que apresentam ciclos sazonais como, por exemplo, a ovelha, a cabra e a égua, são denominados poliéstricos. O grau de degeneração e regeneração do endométrio dos animais monoéstricos é bem maior quando comparado aos poliéstricos (Hafez, 1993). O fator precipitador das modificações degenerativas uterinas é provavelmente a isquemia local. As modificações uterinas regenerativas são induzidas pelo estrógeno e prolongadas pela progesterona, que induz a atividade secretora glandular e influencia o endométrio a produzir uma placenta materna quando estimulada pela presença do blastocisto (Junqueira e Carneiro, 1995).

2.1.2 Míométrio

Formado por uma espessa camada de fibras musculares lisas, o míométrio se divide em uma camada circular interna (*stratum submucosum*) e uma camada longitudinal externa (*stratum subserosum*) que sofrem hipertrofia e hiperplasia durante a gestação. Entre essas duas camadas, ou profundamente na camada circular interna, localiza-se o estrato vascular (*stratum vasculare*) que é composto de grandes artérias, veias e vasos linfáticos, os quais se comunicam com o endométrio (Maximow e Bloom, 1957; Junqueira e Carneiro, 1995). O míométrio sofre ação de hormônios, tais como: progesterona, estrógeno, relaxina, ocitocina e prostaglandina (Nascimento e Santos, 2003).

2.1.3 Perimétrio

O perimétrio é constituído por tecido conjuntivo frouxo revestido pelo mesotélio peritoneal, células musculares lisas e inúmeros vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fibras nervosas. O perimétrio, a camada

longitudinal e o estrato vascular do miométrio são todos contínuos com as estruturas correspondentes do ligamento largo do útero (Maximow e Bloom, 1957; Junqueira e Carneiro, 1995).

2.2 Fertilização e desenvolvimento do blastocisto

O desenvolvimento de um novo indivíduo requer a transferência dos gametas masculinos para o sistema genital feminino com a finalidade de fertilizar os gametas femininos. Para isso, os espermatozoides precisam sofrer certas modificações no interior do trato reprodutor feminino, de modo a adquirir capacidade para penetrar a zona pelúcida e fertilizar o ovócito, por um processo denominado capacitação. Esta consiste na remoção das glicoproteínas, originárias do plasma seminal, da superfície celular espermática e na ativação das enzimas hidrolíticas (Hafez, 1993).

O processo de fertilização ocorre quando há a fusão dos gametas masculino e feminino para formar uma única célula chamada zigoto (Hafez, 1993). Este processo ocorre na ampola da tuba uterina, seguido da sua segmentação à medida que o ovócito fertilizado se desloca passivamente em direção ao útero (Hafez, 1993). Por meio de mitoses e clivagens sucessivas, o zigoto torna-se uma estrutura denominada mórula (Guillomot et al, 1993; Junqueira & Carneiro, 1995). As células originadas pela segmentação do zigoto chamam-se blastômeros (Maximow e Bloom, 1957; Hafez, 1993; Junqueira e Carneiro, 1995).

Devido ao acúmulo gradual de líquido ocorre o surgimento de uma cavidade na porção central da mórula (Maximow e Bloom, 1957; Hafez, 1993; Junqueira e Carneiro, 1995). Os blastômeros, afastados pelo líquido advindo da tuba, passam a constituir uma camada periférica, o trofoblasto ou trofectoderma, com uma área

espessa, a massa celular interna que faz saliência para o interior da cavidade, compreendendo assim, a fase de blastocisto (Maximow e Bloom, 1957; Guillomot et al, 1993; Hafez, 1993; Weitlauf, 1994; Junqueira & Carneiro, 1995). Ambas as categorias celulares do blastocisto são essenciais para o desenvolvimento embrionário: o trofoblasto está envolvido nas interações com o útero resultando na implantação, enquanto a massa celular interna dará origem ao embrião e aos folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma). A interação, associação e desenvolvimento desses folhetos resultam na diferenciação dos tecidos e órgãos do feto e também na formação das membranas fetais (Guillomot et al, 1993). A passagem do blastocisto da tuba uterina ao útero é controlada pela ação do estrogênio e também ocorre pelo auxílio de fracos movimentos peristálticos da tuba uterina e por movimentos ondulares dos cílios das células epiteliais (Bishop, 1969). O período da chegada do embrião ao útero, assim como a implantação é variável entre as espécies animais (Guillomot et al, 1993; Jainudeen e Hafez, 1993; Weitlauf, 1994; Junqueira & Carneiro, 1995). Porém na rata, esses períodos correspondem 3-4 dias e 5 dias, respectivamente (Guillomot et al., 1993).

O período correspondente a 4-5 dias ainda propicia ao útero o término da sua resposta inflamatória no que diz respeito à remoção dos espermatozoides e também possibilita a secreção de nutrientes pelas glândulas endometriais, sob a ação da progesterona originada do corpo lúteo (Junqueira & Carneiro, 1995). As necessidades nutritivas do blastocisto são supridas pelas secreções advindas da tuba uterina e do útero. Após sua chegada no útero, o blastocisto permanece um período em contato com o endométrio e é envolvido pela secreção das glândulas endometriais (Junqueira & Carneiro, 1995). É importante salientar que o termo embrião passa a ser empregado

desde o estágio de blastocisto até que ocorra diferenciação dos sistemas de órgãos e da placenta. Após esse estágio o conceito é denominado feto (Hafez, 1993).

2.3 Implantação embrionária

A implantação é considerada um passo de grande importância para os mamíferos no estabelecimento da gestação e requer o completo sucesso de eventos sequenciais tais como o desenvolvimento materno uterino, o desenvolvimento e a fixação do conceito e a formação da placenta (Imakawa et al, 2004). Esse fenômeno ocorre quando, ainda na fase de blastocisto, a zona pelúcida se rompe permitindo que as células trofoblásticas entrem em contato direto com o endométrio ao qual se aderem. Imediatamente começa uma multiplicação intensa dessas células que irão assegurar a sua nutrição por meio do endométrio. Porém, a massa celular interna que dará origem ao embrião, desenvolve muito pouco nesta fase. Salienta-se que nenhuma outra camada embriogênica é hábil para iniciar a implantação (Guillomot et al., 1993). As células trofoblásticas fixam-se diretamente ao endométrio, entretanto, a massa celular interna é requerida para a manutenção do trofoblasto, indicando assim que ambos estão envolvidos no sucesso da implantação (Imakawa et al., 2004).

A implantação ocorre quando o endométrio está na fase secretora, apresentando glândulas com moléculas nutrientes para o embrião, vasos sanguíneos dilatados e a lâmina própria ligeiramente edemaciada (Junqueira & Carneiro, 1995). O trofoblasto é capaz de obter os nutrientes do útero por meio de endocitose e também por fagocitose (Schlafke e Enders, 1975). Esse fenômeno se intensifica à medida que aumenta a função nutricional do trofoblasto, particularmente nas espécies em que a implantação é tardia e a atividade secretora é alta (Guillomot et al., 1993).

Embora possam existir diferentes processos de implantação entre os mamíferos, o blastocisto apresenta características similares em todas as espécies. Tal evento pode ser resumido como uma série de interações complexas entre dois tecidos, o endométrio e o trofoblasto, que darão origem às estruturas placentárias (Guillomot et al., 1993). Com exceção das espécies que possuem o tipo de placentação superficial (epiteliocorial), todos os embriões mamíferos penetram o epitélio uterino e a lâmina basal com a finalidade de estabelecer uma relação vascular definitiva com a mãe. No entanto, este processo varia consideravelmente de espécie para espécie no que diz respeito ao período de implantação e suas características citológicas (Weitlauf, 1994).

A implantação em roedores e primatas difere daquela que ocorre nos animais domésticos fixando-se, algumas horas depois da sua entrada no útero, ao endométrio, introduzindo-se no útero materno. Já nos animais domésticos, existe um período de pré-implantação (denominada fase pré-receptiva do útero) prolongado após a chegada do embrião no útero, o que possibilita a migração do embrião, secreção pelas glândulas endometriais uterinas e à sinalização do conceito para o reconhecimento materno da gestação. Além disso, nessas espécies não há invasão ou deslocamento do tecido materno pelo tecido fetal e o conceito permanece no lúmen uterino durante todo o período gestacional (implantação epiteliocorial). Entretanto em carnívoros, roedores e primatas, o blastocisto é gradualmente implantado intersticialmente no endométrio através da penetração do trofoblasto no útero (implantação hemocorial e endoteliocorial) (Guillomot et al., 1993).

O processo de implantação pode ser subdividido em vários estágios delineados pela interação celular entre o trofoblasto e o endométrio uterino (Schlafke e Enders,

1975; Enders, 1976; Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994; Bowen e Burghardt, 2000; Dey et al., 2004; Armant, 2005).

A desintegração da zona pelúcida é o primeiro estágio da implantação. Ela se dá pela lise enzimática por meio das proteases advindas do útero materno e/ou do próprio embrião. Após a perda da zona pelúcida o blastocisto é posicionado e imobilizado no útero por um período de tempo variável e sua orientação será determinada conforme a espécie animal. Sendo assim, a posição do embrião na cavidade uterina pode ser classificada como central (coelhos, eqüinos, suínos, bovinos, ovinos) ou excêntrica com (ratos e camundongos) ou sem formação de uma câmara de implantação (mulher). A orientação do blastocisto também pode ser definida com base na posição do disco embrionário, tendo como referência o mesométrio, como mesometrial (ratos, camundongos, coelhos), antimesometrial (carnívoros) ou lateral (mulher). O primeiro contato do embrião com o endométrio pode ser denominado como antimesometrial (ratos, camundongos, coelhos), mesometrial (morcegos frugíferos), lateral (mulher), difuso (suínos, eqüinos) ou cotiledonário (bovinos, ovinos). (Schlafke e Enders, 1975; Enders, 1976; Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994; Bowen e Burghardt, 2000; Dey et al., 2004; Armant, 2005).

O terceiro estágio é denominado estágio de aposição. Durante esta fase, existe um íntimo contato entre as células epiteliais uterinas com as células trofoblásticas, vista em todas as espécies, porém estas células ainda não penetram o endométrio. No estágio de adesão, a fixação do blastocisto no endométrio ocorre por meio da interdigitação dos microvilos uterino e a membrana celular trofoblástica. Nos roedores e na mulher, junções celulares especializadas, denominadas desmossomos, são observadas entre os dois tecidos. Esse estágio representa a última fase da implantação em espécies que possuem

placentação do tipo epiteliocorial (Schlafke e Enders, 1975; Enders, 1976; Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994; Bowen e Burghardt, 2000; Dey et al., 2004; Armant, 2005).

A invasão endometrial implica na penetração da lâmina basal epitelial pelo trofoblasto. Três categorias de penetração endometrial são descritas: implantação por deslocamento (ratos, camundongos e alguns primatas), implantação por fusão (coelhos) e implantação por intrusão (carnívoros). (Schlafke e Enders, 1975; Enders, 1976; Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994; Bowen e Burghardt, 2000; Dey et al., 2004; Armant, 2005).

A implantação do blastocisto é dependente de alguns fatores embrionários intrínsecos que operam em conjunto com sinais extrínsecos advindos do sistema genital feminino (Armant, 2005). O sucesso da implantação embrionária está fortemente correlacionado aos processos envolvendo hormônios, citocinas, moléculas de adesão, enzimas e fatores de crescimento (Dey et al., 2004).

Dentre alguns fatores intrínsecos produzidos pelo próprio embrião, que são reconhecidos pela mãe, se destacam: o fator ativador de plaquetas que produz vasodilatação local e provavelmente tem ação autócrina ou parácrina no início da implantação, além de outras moléculas como histamina, prostaglandinas e algumas glicoproteínas específicas que são secretadas pelo embrião e que desempenham papel importante na implantação. Nas espécies em que o corpo lúteo não produz estrógeno, o embrião secreta esse hormônio durante a fase de implantação. No caso dos suínos, por exemplo, o trofoblasto produz uma quantidade significativa de estrógeno (Guillomot et al., 1993).

As modificações hormônio-dependentes do processo de proliferação e diferenciação

ocorrem em todos os compartimentos do endométrio e são essenciais, tanto para a receptividade do embrião quanto para o desenvolvimento da reação decidual (Weitaluf, 1994). Vários fatores endometriais, controlados pela ação da progesterona e do estrógeno, são conhecidos por regular a receptividade uterina o que resulta no sucesso da implantação. Em roedores e primatas, a implantação é estabelecida quando o estrógeno age sobre o endométrio que está sob influência da progesterona. Além disso, um embrião que entra no útero antes dele ter sido preparado pela progesterona não implantará. Sendo assim, tanto o estrógeno quanto a progesterona são reguladores diretos da receptividade uterina, apesar de que os mecanismos exatos pelos quais isso ocorre ainda não estão bem estabelecidos. A influência do estrógeno e da progesterona tem sido examinada pela exclusão dos receptores de estrógeno e progesterona nas células uterinas (Imakawa et al., 2004).

A implantação é dependente de uma seqüência básica hormonal que é comum a todas as espécies. Um pico pré-ovulatório de estrógeno, devido ao crescimento dos folículos ovarianos, tem efeito preparatório sobre a maturação do endométrio e uma secreção luteal de progesterona e, em alguns casos, de estrógeno, tem importância no momento da implantação (Guillomot et al., 1993). Na maioria das espécies, as células endometriais (estroma e epitélio) são diferentemente sensíveis aos hormônios ovarianos. Na rata, a progesterona luteal desempenha dois papéis: um sob a superfície do epitélio, onde ela bloqueia a síntese de receptores para estrógeno e induz a proliferação celular e o outro sob o estroma, e provavelmente também nas glândulas endometriais, onde a progesterona estimula a síntese de receptores para estrógeno e permite a proliferação predecidual pela ação sinérgica com esse hormônio (Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994).

Os ativadores de plasminogênio são proteases séricas importantes na implantação embrionária, visto que, estas proteases são responsáveis pela conversão do plasminogênio em uma potente plasmina. Por sua vez, a plasmina pode degradar direta ou indiretamente todos os componentes da matriz extracelular. Em estudos realizados *in vitro* e *in vivo* com embriões de ratos foi detectada a presença dessas proteases no trofoblasto do blastocisto apoiando a hipótese de que os ativadores de plasminogênio assumem papel importante no processo de implantação embrionária e que a razão de uma baixa taxa de implantação envolve a redução da atividade destes ativadores (Aflalo et al., 2005).

Muitas citocinas são expressas no útero, porém somente algumas têm sido requeridas para a implantação do trofoblasto no endométrio (Weitlauf, 1994; Imakawa et al., 2004; Rahman et al., 2004). O fator inibitório da leucemia (LIF) é uma citocina pleitrófica requirida para a implantação do blastocisto em camundongos. A expressão uterina da LIF e de seus receptores tem sido demonstrada em muitas espécies mamíferas indicando, assim, que essa citocina possui ampla importância no estabelecimento da gestação (Vogiagis e Salamonsen, 1999). De acordo com Kimber (2005), a LIF é uma das citocinas mais importantes no sistema genital e sem a expressão dessa citocina no útero a implantação não se inicia.

Durante a reação de fixação, muitas classes de proteínas participam na interação entre o trofoblasto e o epitélio uterino (Dey et al., 2004), porém a adesão na matriz extracelular parece ser mediada predominantemente por integrinas (Sutherland et al., 1993; Basak et al., 2002; Armant, 2005). Subunidades de integrinas têm sido observadas nas células trofoblásticas de embriões de camundongos durante o período de implantação e a expressão anormal de certas subunidades de integrinas tem sido associada à falhas na

implantação e no desenvolvimento da placenta (Basak et al., 2002).

A expressão de vários fatores de crescimento e seus receptores no útero, em um espaço temporal e celular específico durante o período de pré-implantação, sugere que esses fatores são importantes para a implantação (Weitlauf, 1994; Dey et al., 2004). Várias evidências sugerem que o fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF) tem papel importante no desenvolvimento da pré-implantação do embrião e implantação como um fator parácrino e/ou justácrino em várias espécies (Dey et al., 2004). A presença do blastocisto é necessária para a expressão do HB-EGF, seguida pela produção de betacelulina, epiregulina, neuregulina-1 e cicloxygenase-2 com a fixação do blastocisto no epitélio luminal (Armant, 2005; Dey et al, 2004). Os hormônios ovarianos e o fator de crescimento epidérmico (EGF) exercem papel importante na proliferação e decidualização das células do estroma durante a gestação. Dai e Ogle (1999) observaram que o receptor do EGF é uma proteína dependente de progesterona associada à proliferação e decidualização das células estromais.

2.4 Decidualização

A implantação do blastocisto no útero receptivo está associada a uma série de eventos, isto é, com a reação da fixação do embrião, seguida da decidualização do estroma. Portanto, do ponto de vista citológico, a reação decidual consiste na diferenciação dos fibroblastos do estroma (Guillomot et al. 1993; Weitlauf, 1994). Na mulher, essas células se tornam alongadas e poliplóides, assumindo um aspecto epitelióide, e o endométrio passa a ser chamado de decídua. Distinguem-se a decídua basal, situada entre o embrião e o miométrio; a decídua capsular, entre o embrião e a luz uterina; e a decídua parietal,

que é o restante da decídua (Junqueira e Carneiro, 1995; Dey et al, 2004).

Nas espécies em que não ocorre invasão do epitélio uterino pelo trofoblasto, o estroma não sofre modificação significativa durante a implantação. A decidualização é considerada moderada nos carnívoros, e muito marcante nos insetívoros, roedores e alguns primatas incluindo o homem (Guillomot et al., 1993; Weitlauf, 1994). Nos roedores, a reação decidual é consequência da fixação do blastocisto e de processos organogênicos e implica não somente na proliferação e diferenciação dos fibroblastos, mas também na atrofia glandular, neoformação de uma rede estromal fibrosa, proliferação vascular e na formação de uma câmara de implantação (Guillomot et al., 1993).

No processo de decidualização estão envolvidas substâncias como histamina, prostaglandinas, leucotrienos e o fator ativador de plaquetas. A permeabilidade vascular e a proliferação e diferenciação celular são fatores importantes que participam do mecanismo da reação decidual. Histamina, leucotrienos e o fator ativador de plaquetas provavelmente estão somente relacionados à resposta vascular, enquanto as prostaglandinas desempenham dois papéis importantes, agindo tanto na permeabilidade vascular quanto na formação das células deciduais. Postula-se que algumas dessas substâncias possam ser produzidas pelo próprio embrião e, desta forma, agem sinergicamente com o estrógeno, induzindo a reação decidual (Guillomot et al, 1993; Weitlauf, 1994). Como consequência dessas modificações, a decidualização do endométrio resulta no aumento do tamanho e do peso uterino. Esse crescimento não ocorre somente devido à proliferação e diferenciação das células do estroma endometrial como também pela infiltração de uma variedade de células derivadas da medula óssea e ao edema tissular causado pelo aumento da permeabilidade local (Weitlauf, 1994).

A reação decidual também pode ser induzida por diferentes estímulos não embriogênicos, tais como: curetagem, choque elétrico, instilação de óleo intra-uterina, CO₂, prostaglandinas, etc. Desta forma, estudos têm sido realizados em ratas com pseudogravidez como modelo experimental (Kleinfeld e O' Shea, 1983).

2.5 Diferenciação trofoblástica

A implantação do blastocisto é o passo inicial da placentação e o trofoblasto compreende o maior componente da placenta (Armant, 2005). Após a implantação do trofoblasto nas células endometriais, ocorre sua diferenciação em células gigantes trofoblásticas e as células que formam a parede original do blastocisto são referidas como espongiotrofoblasto (Kaufmann e Burton, 1994; Armant, 2005). O sinciotrofoblasto está localizado mais externamente, possui núcleos volumosos e o citoplasma é contínuo, formando um sincício e enquanto o espongiotrofoblasto é constituído por uma camada irregular de células ovóides e mononucleadas (Junqueira & Carneiro, 1995). Essas últimas agem como uma população de células-tronco e sua rápida divisão e subsequente fusão com o leva à contínua expansão da camada (Kaufmann e Burton, 1994; Armant, 2005).

O trofoblasto é o primeiro epitélio polarizado a aparecer durante o desenvolvimento do mamífero. Ele não contribui para a formação de nenhum tecido fetal, porém contribui para a formação da placenta e das membranas extra-embriônicas. O feto é derivado de um agrupamento de células não polares, pluripotentes situadas excêntrica no interior do blastocisto denominada massa celular interna (Armant, 2005). Durante a implantação em camundongos, os componentes da massa celular interna e o trofoblasto polar (porção que não sofreu contato com o endométrio) se desenvolvem

no ectoderma extra-embriônico e no cone ectoplacentário, respectivamente (Adamson et al, 2002). As células citotrofoblásticas são derivadas de células precursoras que residem no cone ectoplacentário e são formadas como resultado de endoreduplicação (Cross, 2000).

Considerável diferenciação na linhagem trofoblástica produz diferentes subtipos celulares com funções endócrina, vascular, imunológica e de transporte. Além disso, ocorre reorganização tecidual significativa durante o desenvolvimento placentário que modifica a estrutura uterina e elabora uma área de superfície para troca de nutrientes e gases. Curiosamente os detalhes da especialização do trofoblasto e a morfogênese útero-placentária podem variar consideravelmente entre as espécies mamíferas. No camundongo fêmea, assim como nas ratas, a placenta é discóide sendo constituída por três estruturas celulares trofoblásticas distintas: o labirinto trofoblástico (da superfície fetal o tecido conjuntivo corioalantóico se estende para o interior do labirinto que compreende a maior porção do disco placentário), a camada do espongiotrofoblasto (formada da parede original do blastocisto e permanece unicelular) e a camada de células gigantes trofoblásticas (formada a partir da penetração das células trofoblásticas no endométrio) (Kaufmann e Burton, 1994; Cross, 2000).

As células citotrofoblásticas são células invasivas e interagem com os vasos sanguíneos maternos. Nos roedores, essas células são menos invasivas. No entanto, elas produzem fatores angiogênicos e vasodilatadores que promovem o fluxo de sangue materno para o local da implantação (Shweiki, 1993; Cross, 2000; Smith, 2001). Além disso, as células citotrofoblásticas são a maior fonte de fatores que afetam outros processos fisiológicos maternos que inclui os hormônios luteotróficos e lactogênicos da família dos hormônios estruturalmente

relacionados à prolactina pituitária (PRL) (Soares et al., 1998; Rasmussen et al., 1997) e a proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) que promove a ativação das células NK uterinas (Cross, 2000).

As células gigantes trofoblásticas forma uma camada contínua que contém alta concentração de organelas. Microvilosidades são encontradas sobre a superfície durante a gestação, embora sua densidade e morfologia possam variar de acordo com a fixação (Kauffmann e Burton, 1994). A superfície dessas microvilosidades é rica em diferentes enzimas, particularmente fosfatase alcalina, 5'-nucleotidase, hexoquinase, alfa-amilase, proteinoquinases e transferases galactosila e sialil. Figuras de mitose nunca são observadas nessas células e a transcrição é reduzida. A geração e manutenção dessa camada dependem da contínua incorporação das células citotrofoblásticas dentro dela (Kauffmann e Burton, 1994).

2.6 Proliferação e apoptose durante a gestação

Durante a gestação, o útero sofre uma série de modificações que resulta em uma extensa reorganização tecidual com o objetivo de acomodar o conceito. Desta forma, para o sucesso da implantação embrionária é necessário que haja um balanço entre proliferação e morte celular. Isso se torna importante, pois já foi visto que o aumento do nível de apoptose está associado à falha na gestação em humanos (Kokawa et al., 1998).

Durante a implantação do blastocisto, a degeneração celular do tecido decidual avança da região antimesometrial para a região mesometrial para a acomodação do conceito (Gu et al., 2005). A morte celular decidual na região da câmara antimesometrial em ratos e camundongos ocorre por apoptose (Parr et al., 1987;

Joswig et al., 2003; Gu et al., 2005). No entanto, também já foi documentado que a morte celular decidual em diferentes regiões e estágios da gestação ocorre por apoptose e secundariamente por necrose (Correia-da-Silva et al., 2004). Akcali et al. (2003) observaram que a morte celular programada ocorre *in vitro*, semelhante ao que ocorre *in vivo*.

As células do estroma decidualizadas do mesométrio (decídua basal) proliferam durante o início da gestação e depois sofrem um ciclo de regressão que se inicia durante o terço final da gestação e continua até o parto (Ogle et al., 1998a). Estudos em ratos demonstraram que a regressão das células deciduais no pólo mesometrial, do início até a metade da gestação, está relacionada à expressão de níveis de proteínas Bax e Bcl2, respectivamente. A Bax é uma proteína que promove a morte celular enquanto a Bcl-2 promove a proteção celular contra a apoptose. Além disso, a taxa de proteínas determina a quantidade e a distribuição espacial da apoptose. Esse balanço é regulado pela progesterona, visto que a aplicação de um antagonista da progesterona resulta no aumento da taxa de Bax/Bcl-2 e aumenta a apoptose decidual (Dai et al., 2000). Por outro lado, Ogle et al (1998b) observaram que a progesterona também é essencial para a proliferação celular estromal durante o início da gestação, porém sua ação é perdida aos 14 dias.

2.7 Efeito dos hormônios sexuais e tireoidianos no sistema genital feminino

Os hormônios sexuais têm papel importante no desenvolvimento, na diferenciação e na função dos tecidos do trato reprodutivo feminino nas diferentes espécies animais e na mulher. Esses tecidos apresentam receptores, que são proteínas solúveis intracelulares, responsáveis pelo reconhecimento e transdução da mensagem hormonal (Robel, 1993). Vários estudos têm

sido realizados com relação à localização de receptores para hormônios sexuais no trato reprodutivo de ratas (Anderson et al., 1975; Cidlowski e Muldoon, 1975; Ruh e Bandedistel, 1977; Pelletier et al., 2000; Wang et al., 2000). Segundo Wang et al. (2000), a ação dos hormônios sexuais é primariamente mediada por um processo que envolve a ligação do hormônio a receptores específicos nas células alvo, que comanda a ativação transcricional do gene responsivo ao esteróide e, subseqüentemente, a modificação da resposta celular.

Os hormônios sexuais também exercem grande influência no desenvolvimento da placenta durante a gestação. Estudos demonstram a expressão de receptores para progesterona e estrógeno na placenta desde o início da gestação até o terço final. A progesterona exerce grande influência na proliferação, decidualização, assim como na regressão das células estromais mesometriais (Ogle et al., 1989; Ogle et al., 1997; Ogle et al., 1998a; Ogle et al., 1998b; Daí e Ogli, 1999). Após a ovulação e durante o período gestacional, a progesterona torna-se um hormônio uterotrópico essencial para a decidualização (Kauffmann e Burton, 1994), para a expressão de receptores para progesterona e estrógeno (Ogle et al., 1998a) e para o progresso do ciclo celular no estroma (Ogle et al., 1998b). Segundo Weitlauf (1994), a decidualização das células estromais uterinas durante o estabelecimento da gestação nas ratas ocorre em dois estágios. Primeiramente o estágio de decidualização inicia-se no pólo antimesometrial seguido da decidualização no pólo mesometrial do útero. Esses processos são iniciados graças a ação coordenada da progesterona e do estrógeno. A diferenciação, induzida pela progesterona, é um pré-requisito para a fertilização do ovócito e implantação do embrião. Nas ratas este processo envolve a reação decidual onde as células estromais semelhantes a fibroblastos sofrem diferenciação e adquirem o fenótipo

decidualizado (Piva et al., 1996; Tseng e Zhu, 1997). A proliferação das células estromais endometriais possui importante papel na reação decidual e este processo é dependente da ação da progesterona (Tseng e Zhu, 1997).

Os hormônios da tireóide apresentam efeito direto sobre o útero, regulando a responsividade do órgão ao estrógeno (Gardner et al., 1978). Cidlowski e Muldoon (1975) observaram que a tireotoxicose em animais adultos diminui a resposta do útero ao estrógeno, sugerindo que os hormônios tireoidianos tenham maior efeito durante o desenvolvimento uterino. Além disso, estudos relatam a presença de receptores específicos de T₃ no interior do núcleo de células uterinas e isso levanta a possibilidade de que esse hormônio possa ter efeito direto sobre o útero (Evans et al., 1983; Mukku et al., 1983). Provavelmente, por essa razão o hipotireoidismo diminui a resposta de células uterinas ao estrógeno, diminuindo a taxa mitótica de células epiteliais, estromais e miometriais (Kirkland et al., 1981). Esse efeito causa diminuição do peso uterino, do volume absoluto do endométrio e da camada muscular no útero de ratas (Inuwa e Williams, 1996; Armanda-Dias et al., 2001), sugerindo que essas mudanças sejam, em parte, responsáveis pelas dificuldades reprodutivas observadas no hipotireoidismo.

Há comprovação de que a hipofunção tireoidiana reduz significativamente o peso dos ovários e o número de folículos secundários e terciários e de corpos lúteos sem, no entanto, alterar a porcentagem de folículos atresícos e o número de folículos primários e pré-ovulatórios. Além disso, o hipotireoidismo reduz significativamente a espessura do endométrio, o número de glândulas endometriais e a altura do epitélio do infundíbulo tubárico (Silva et al., 2004). Por outro lado, o hipertireoidismo estimula a foliculogênese ovariana e diminui a atresia folicular em ratas púberes (Serakides et al.,

2001). O hipertireoidismo também induz modificações significativas no útero de ratas pré-púberes aumentando significativamente a espessura da parede uterina, e após a maturidade sexual essas modificações ocorrem tanto no útero quanto na tuba uterina em intensidade variável e dependente da fase do ciclo estral (Oliveira et al., 2005). Esses achados indicam que tais mudanças no útero de ratas hipertireóideas podem dar maior suporte ao incremento da foliculogênese com conseqüente aumento da taxa de gestação, já que foi relatado também que ratas gestantes hipertireóideas parem maior número de filhotes (Rosato et al., 1992).

2.8 Involução uterina

A regressão do útero ao seu estado normal anterior a gestação que se inicia logo após o parto e se completa após a renovação total do epitélio uterino é denominada involução uterina. Essa regressão ocorre devido a uma combinação de atrofia e perda celular sob ação de vários fatores (Morton e Goldspink, 1986). Um dos mais impressionantes exemplos de uma rápida e massiva degradação tissular que ocorre, sob condições fisiológicas, pode ser observado na involução do útero de mamíferos. Processo pelo qual envolve a reabsorção de diversos componentes tissulares, incluindo proteína muscular e material celular, proliferação celular, apoptose e a remodelação do tecido conjuntivo. De interesse particular é a rápida degradação do colágeno, uma proteína que normalmente mostra uma atividade metabólica mínima (Woessner Jr., 1979). Takamoto e Leppert (1998), observaram que a apoptose e a proliferação celular estão relacionadas com a degradação de colágeno na involução uterina em ratas.

Durante a gestação o útero aumenta consideravelmente de tamanho e uma das razões que contribuem para isso é o aumento

na taxa de colágeno. As células da musculatura lisa do miométrio são capazes de produzir colagenase, a enzima responsável pela degradação massiva do colágeno durante a involução uterina no pós-parto (Welgus et al., 1985; Blair et al., 1986). Segundo Blair et al. (1986) a colagenase é produzida somente em quantidade necessária, não sendo, portanto, estocada intra ou extracelularmente. Após o parto, a concentração de colagenase aumenta gradualmente até o terceiro dia pós-parto e diminui próximo do quinto dia (Takamoto e Leppert, 1998).

Assim como na gestação, os hormônios sexuais também participam na involução uterina. No pós-parto, os níveis de receptores para estrógeno e progesterona são regulados pelos mesmos mecanismos conhecidos durante o estágio não gestacional (Geyer et al., 1982). O “turnover” celular e as mudanças bioquímicas e morfológicas ocorridas durante o período de involução uterina estão fortemente associados e os hormônios gonadais parecem influenciar essas mudanças e retardar a involução uterina (Takamoto e Leppert, 1998). Em ratas, a taxa de degradação do colágeno durante a involução do útero no pós-parto está correlacionada com a atividade da colagenase. A administração de estrógeno inibe a degradação do colágeno no quarto dia de involução e leva à diminuição na atividade da colagenase (Woessner Jr., 1979). Halme e Woessner Jr. (1975), demonstraram o efeito da progesterona sobre a degradação do colágeno e sua atividade colagenolítica durante a involução uterina, observando que a administração de altas doses de progesterona retardou significativamente a involução e a degradação do colágeno. A relaxina pode estimular a síntese de colágeno como ocorre no desenvolvimento do útero, porém seu efeito no pós-parto, na presença do estrógeno, causa efeito anti-catabólico sobre o útero (Adams e Frieden, 1985).

No processo de involução também estão envolvidas algumas enzimas importantes que são responsáveis pela degradação do colágeno. Essas enzimas são hidrolases ácidas presentes em elevada concentração durante o pós-parto e em baixa concentração durante a gestação. A concentração dessas enzimas aumenta significativamente até o quarto dia pós-parto e alcança seu pico máximo no mesmo período em que o teor de colágeno declina (Woessner Jr., 1979). Há evidências de que as metaloproteinases da matriz, enzimas que agem fora da célula hidrolizando a matriz extracelular, também estão envolvidas na involução uterina. Essas proteases atingem sua concentração máxima no segundo dia pós-parto (Wolf et al., 1996). Brandes e Anton (1969) observaram que a fosfatase ácida está localizada no interior de macrófagos, no endométrio de ratas, durante o período de involução pós-parto e, nessas células, intensa atividade fagocítica e pinocítica, também foi acompanhada pelo desenvolvimento de abundantes lisossomos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura dos Laboratórios de Experimentação Animal e Histopatologia (Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias) da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório de Patologia Comparada (Departamento de Patologia Geral) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.1. Experimento 1

Foram utilizadas 36 ratas *Wistar* adultas com 45 dias de idade e alojadas em caixas plásticas (seis animais/caixa) onde receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,6% 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 sete dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em dois grupos, tratado e controle, sendo cada um composto por 18 animais. O grupo tratado foi induzido ao hipertireoidismo mediante administração diária de L-tiroxina na água de beber, numa concentração de 2 µg/ml até o final do experimento, enquanto os animais do grupo controle foram mantidos em estado eutireóideo, recebendo apenas água destilada.

Diariamente era realizada a mensuração do consumo de ração e água por caixa. A quantidade de L-tiroxina¹ ingerida diariamente por cada animal do grupo tratado era estimada pela quantidade diária de água consumida, dividindo-se o valor encontrado pelo número de animais da caixa.

Após 60 dias do início do tratamento, ou seja, da indução ao hipertireoidismo, tempo suficiente para induzir aumento da taxa de ovulação (Serakides et al., 2001), as fêmeas, de ambos os grupos, foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de quatro fêmeas para cada macho. Após este período, foram realizados esfregaços vaginais diariamente em todas as ratas, a fim de detectar a presença de espermatozóides. A cópula era confirmada pela presença destes na citologia vaginal e esse dia era designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas individualmente em caixas plásticas.

Aos sete, 14 e 19 dias de gestação, ou seja, primeiro, segundo e último terço da gestação, respectivamente, seis animais de cada grupo foram sacrificados. O sacrifício, por punção cardíaca, foi precedido de

¹ L-thyroxine, Sigma, Sant Louis, USA.

anestesia pelo uso de pentobarbital sódico 2,5% (30 mg/Kg) por via intra-peritoneal.

Após o sacrifício, a tireóide, os ovários e o útero juntamente com a placenta e os fetos foram colhidos. Os discos placentários e os fetos de cada corno uterino foram quantificados. Após a pesagem, o útero foi aberto, de modo a preservar a parede uterina, para a retirada dos fetos, pesagem e quantificação do número de fetos ou embriões viáveis e inviáveis, sendo que o disco placentário e seus anexos ainda foram

preservados *in situ* (Fig. 1). Foram considerados fetos inviáveis aqueles que exibiram características morfológicas anormais tais como diminuição do tamanho, quando comparado aos outros fetos localizados no útero do mesmo animal, coloração esbranquiçada, esverdeada ou até enegrecida e consistência friável ou amolecida. Em seguida, considerando-se o tamanho da ninhada foi determinada a porcentagem de fetos ou embriões viáveis e inviáveis no útero de cada fêmea.



Figura 1. Rata gestante (grupo controle). Abertura do útero (U) para remoção do feto (F) com preservação da parede uterina e do disco placentário (D) *in situ*.

O processamento do útero ainda incluiu a retirada de um fragmento, realizado por meio de uma secção transversal, contendo o disco placentário. Esses órgãos foram fixados em formol a 10% neutro e

tamponado e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet et al., 1992). Cortes histológicos de 4 μ m de todos os órgãos colhidos à necropsia foram

corados pela técnica da hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica.

Ambos os ovários foram pesados, para obtenção do peso médio e em seguida foram realizadas quatro secções longitudinais. Após sua fixação e processamento histológico, os ovários foram avaliados morfológicamente e aos sete dias de gestação, todas as estruturas ovarianas foram quantificadas de acordo com Serakides et al. (2001) a fim de verificar se houve aumento da taxa de ovulação.

No útero, corado em HE, foi determinada a espessura do endométrio e miométrio em 50 pontos aleatórios com auxílio de uma ocular micrométrica em objetiva de 10×. O diâmetro transversal médio dos discos placentários de ambos os cornos uterinos, foi mensurado em objetiva de 4×. A espessura de cada camada (labirinto placentário, espongiotrofoblasto e células gigantes trofoblásticas) de um dos discos placentários, escolhido aleatoriamente, de cada animal também foi mensurada. A espessura do labirinto placentário foi determinada em 10 pontos em objetiva de 4× e a espessura do espongiotrofoblasto e de células gigantes trofoblásticas foi determinada em 30 pontos aleatórios em objetiva de 10×. O diâmetro médio nuclear das células trofoblásticas foi mensurado em 30 células em objetiva de 100×. Posteriormente esses valores também foram convertidos para micrômetros com auxílio de uma lâmina micrométrica.

O número de pontos e núcleos para a análise morfométrica foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou. Em uma lâmina do útero contendo o disco placentário do grupo controle foram mensurados a espessura das camadas do disco placentário (labirinto, espongiotrofoblasto e células gigantes trofoblásticas) e do útero (endométrio e

miométrio) e o diâmetro médio do núcleo das células trofoblásticas em 100 pontos e em 100 células, respectivamente. A seguir os dados foram sorteados em dez grupos. Foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das variáveis estudadas em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 pontos ou células. Após verificar que o desvio padrão e o coeficiente de variação se estabilizavam em torno de um determinado número de pontos ou células, este número foi adotado para se determinar a mensuração das camadas do disco placentário e do útero e o diâmetro médio das células trofoblásticas.

A confirmação do hipertireoidismo foi feita mediante a análise morfométrica da tireóide associada aos sinais clínicos das ratas, que incluíam polidipsia, polifagia, agressividade, inquietação. Na análise histomorfométrica da tireóide foi mensurada, ao acaso, a altura do epitélio de 30 folículos, em quatro pontos distintos, obtendo-se o valor médio das quatro mensurações. Esta foi realizada com auxílio de uma ocular micrométrica e objetiva de 40×. Às médias foi aplicado um fator de correção obtido com a escala de uma lâmina micrométrica.

Secções histológicas do útero, incluindo o disco placentário também foram submetidas à análise imunoistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti-CDC47 (clone 47DC141) e o anticorpo anti-caspase-3 (clone RB-1197-P)², para determinação da taxa de proliferação celular e de apoptose, respectivamente.

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase³, sendo empregada a técnica de recuperação antigênica através da utilização de solução Retrieval, durante 20 minutos. Os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida por 1 hora com

²Dako, USA

³ Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use- Lab Vision.

o anticorpo primário (CDC47 - diluição de 1:200 ou caspase 3 – 1:300)⁴ e por 15 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio⁵, anticorpo secundário⁶ e estreptavidina peroxidase⁷. O cromógeno utilizado foi o DAB⁸, em incubação durante 10 minutos. As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. Como controle positivo para o CDC-47 utilizou-se pele de rato e como controle positivo para a caspase 3 foram utilizados cortes de baço de ratas previamente testados. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A determinação da expressão de CDC-47 e de caspase-3 foi realizada pela contagem do número de células positivas em 10 campos, abrangendo toda a secção histológica com objetiva de 40×. Para determinação dessas variáveis foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptada a um Microscópio Olympus BX-40, e utilizado o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. Utilizou-se o software Corel DRAW[®] versão 7.468 para análise das imagens.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com fatorial 2 x 3 (dois grupos x três períodos). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo programa estatístico Instat⁹ e as médias foram comparadas pelo teste SNK. Como o número de fetos não apresentava curva de distribuição normal, as médias entre grupos foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Sampaio, 1998).

⁴ Novacastra Laboratories, United Kingdom

⁵ Ultra Vision Block, Lab Vision

⁶ Biotin Goat, Lab Vision

⁷ Streptavidin Peroxidase, Lab Vision

⁸ DAB Substrate System, Lab Vision

⁹ Graph Pad Software, Versão 3.00, 32 Win 95/NT, Created December 23 1997.

3.2. Experimento 2

Foram utilizadas 12 ratas Wistar com 45 dias de idade (adultas), alojadas em caixas plásticas (seis animais/caixa), onde receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,6% 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 o período de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos: eutireóide (grupo controle) e hipertireóide, sendo cada grupo composto por seis animais. O hipertireoidismo também foi induzido mediante a administração de tiroxina¹ na água de beber, porém numa concentração de 1,6µg/ml, durante a indução, e na dose de 0,8µg/ml, durante a gestação e a lactação.

Após 60 dias do início do tratamento, ou seja, da indução ao hipertireoidismo, as fêmeas, de ambos os grupos, foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de quatro fêmeas para cada macho. Após este período, foram realizados esfregaços vaginais diariamente em todas as ratas, a fim de detectar a presença de espermatozóides. A cópula era confirmada pela presença destes na citologia vaginal e esse dia era designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas plásticas separadas. Após o parto as fêmeas foram mantidas com os seus filhotes até o dia do sacrifício, ou seja, dois dias após o parto.

O sacrifício das mães, por punção cardíaca, foi precedido de anestesia pelo uso de pentobarbital sódico 2,5% (30 mg/Kg) por via intra-peritoneal. O sangue foi colhido em seringas contendo heparina para obtenção imediata do plasma e estocagem a -20°C para posterior dosagem de T4 total. Os filhotes foram sacrificados mediante uma sobredose de pentobarbital sódico 2,5% (30 mg/Kg) por via intra-peritoneal.

À necropsia, a tireóide e o útero foram colhidos. O útero foi separado das tubas e dos ovários e posteriormente pesado. Todos os órgãos foram fixados em formol a 10%, neutro e tamponado, e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet et al., 1992). Após a fixação, os ovários também foram completamente dissecados e pesados. No útero, corado em HE, foi determinada a espessura do endométrio e miométrio em três pontos distintos com auxílio da ocular micrométrica e objetiva de 10x. O diâmetro médio de todos os discos placentários envolvidos também foi mensurado em todos os animais em uma objetiva de 4x.

Secções histológicas do útero e do disco placentário também foram submetidas à análise imunistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti-CDC47 e o anticorpo anti-caspase-3¹⁰, para determinação do índice de proliferação celular e de apoptose, respectivamente. A técnica e os reagentes utilizados foram os mesmos utilizados no experimento 1.

A contagem de células, com expressão de CDC-47 e de caspase-3, foi realizada somente nas camadas uterinas (endométrio e miométrio), utilizando-se objetiva de 40x em 10 campos abrangendo toda a secção histológica. Para a quantificação também foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptado a um Microscópio Olympus BX-40, e utilizado o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. Utilizou-se o software Corel DRAW[®] versão 7.468 para análise das imagens.

A análise histomorfométrica da tireóide foi realizada de forma semelhante ao procedimento adotado no experimento 1. Já o hipertireoidismo neste segundo experimento foi confirmado pela dosagem de T4 total plasmática, pela técnica da

quimioluminescência¹¹ utilizando kits comerciais e seguindo as recomendações do fabricante.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com fatorial 2 x 1 (dois grupos x 1 período). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo programa estatístico Instat¹² e as médias foram comparadas pelo teste SNK (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1

4.1.1. Indução ao hipertireoidismo

De acordo com a tabela 1, pode ser observado que todos os animais tratados com tiroxina apresentaram hipotrofia significativa do epitélio folicular, confirmando o efeito de *feedback* negativo da tiroxina administrada sob a tireóide.

A redução do epitélio folicular das tireóides de ratas tratadas com tiroxina já era esperada, pois a tiroxina foi administrada aos animais, obtendo-se níveis circulantes maiores que os fisiológicos, o que resulta em elevação da concentração sérica de tiroxina, que exerce *feedback* negativo sobre o hipotálamo e a hipófise, diminuindo a produção de TRH e de TSH, respectivamente. Assim, apesar dos animais apresentarem hipertireoidismo iatrogênico, suas tireóides permanecem em estado inativo, caracterizada pelo achatamento do epitélio folicular e aumento da quantidade de colóide, devido à redução da síntese e secreção hormonal (Dickson, 1993; Serakides et al., 2000a).

¹⁰Dako, USA

¹¹ Immulite, DPC, Los Angeles, USA

¹² Graph Pad Software, Versão 3.00, 32 Win 95/NT, Created December 23 1997.

Tabela 1. Altura média do epitélio folicular gestação (Média ± Desvio-padrão) das tireóides (µm) das ratas tratadas ou não com tiroxina aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Grupo	Altura do epitélio folicular (µm)		
	7 dias	14 dias	19 dias
Não tratado	14,38±0,82Ab	15,15±1Ab	13,38±0,82Ab
Tratado	7,96±0,89Aa	7,6±0,34Aa	7,8±0,54Ba

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

Clinicamente, as ratas tratadas com tiroxina apresentavam pêlos arrepiados, não se aglomeravam dentro da caixa, eram agressivas e apresentavam polifagia e polidipsia, sinais clínicos frequentemente observados no hipertireoidismo (Trivalle et al., 1996). Durante os dois meses de indução ao hipertireoidismo e durante todo o período gestacional a média do consumo diário individual de ração e de água (Tab. 2) foi significativamente maior no grupo hipertireóideo. A partir do consumo médio de água/animal/dia, estimou-se que a dose diária de tiroxina/animal/dia foi de $80,28\mu\text{g} \pm 7,07$. Sabe-se que 70 a 80% da tiroxina

administrada, via oral, é absorvida (Nobre et al., 2004), ou seja, no mínimo $56,2\mu\text{g}$ de tiroxina, neste caso, foi absorvida. Esta dose é suficiente para induzir o hipertireoidismo em ratas (Serakides et al., 2000a). Utilizando doses bem menores ($20\mu\text{g}$ de tiroxina/animal/dia) por via subcutânea, Varas et al. (2002) induziram satisfatoriamente o estado hipertireóideo. Por todos esses achados, fica comprovada a indução de hipertireoidismo nas ratas tratadas com tiroxina. Assim, no texto a seguir o grupo tratado passa a ser referido como hipertireóideo e o grupo não tratado como eutireóideo.

Tabela 2. Consumo diário de água e ração gestação (Média ± Desvio-padrão) das ratas tratadas ou não tratadas com tiroxina durante a indução e gestação.

Variáveis	Grupo	
	Não tratado (n=17)	Tratado (n=16)
Consumo de água/indução (ml)	$29,50 \pm 1,11$ B	$40,14 \pm 3,53$ A
Consumo de água/gestação (ml)	$37,38 \pm 5,21$ B	$55,01 \pm 9,76$ A
Consumo de ração/indução (g)	$17,22 \pm 0,51$ B	$20,43 \pm 1,21$ A
Consumo de ração/gestação (g)	$19,96 \pm 2,97$ B	$24,07 \pm 3,14$ A

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

4.1.2. Peso dos animais gestantes

De acordo com a tabela 3, o peso dos animais, subtraído do peso uterino, não apresentou diferença significativa entre grupos e entre períodos, ou seja, o hipertireoidismo induzido pelo período de pouco menos de três meses (dois meses de indução e 19 dias de gestação) não foi

suficiente para reduzir o peso corporal. Em estudo realizado anteriormente, utilizando a mesma dose de tiroxina aqui administrada durante três meses, também não foi observada redução de peso dos animais hipertireóideos (Serakides, 2001). Acredita-se que essa redução seja consequência do hipertireoidismo crônico (Boelaert e Franklyn, 2005).

Tabela 3. Peso dos animais (Média ± Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Grupo	Peso dos animais(g)		
	7 dias	14 dias	19 dias
Controle	276,76 ± 10,59Aa	278,14 ± 26,86Aa	290,31 ± 13,66Aa
Hipertireóideo	282,70 ± 31,97Aa	314,00 ± 28,71Aa	274,36 ± 26,39Aa

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

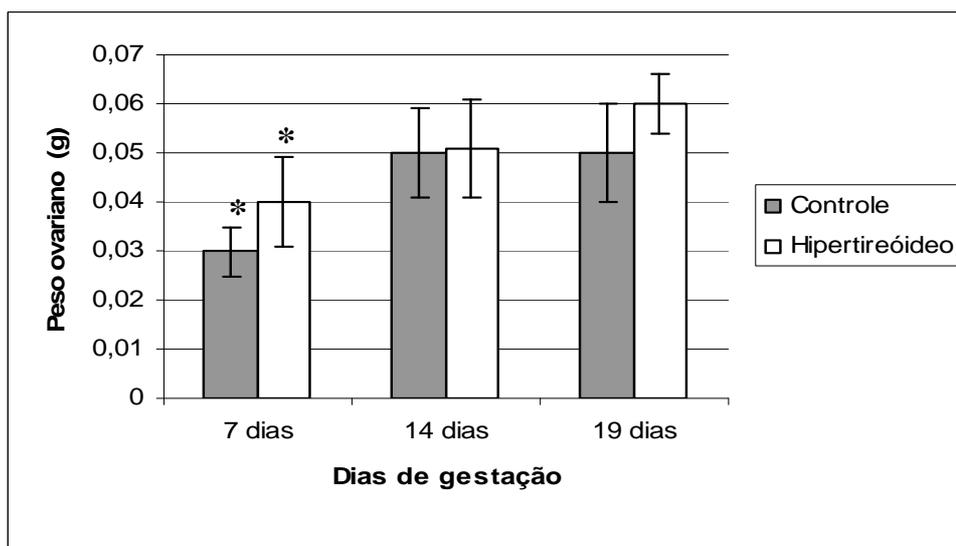
4.1.3. Histomorfometria ovariana

A fim de comparar a atividade ovariana entre os grupos e verificar se houve no grupo hipertireóideo maior taxa de ovulação, foi realizada a pesagem dos ovários, bem como a quantificação dos corpos lúteos e folículos ovarianos.

O peso médio dos ovários, por animal, aos sete dias de gestação foi significativamente maior nas ratas hipertireóideas. Mas, aos 14 e 19 dias de gestação o peso ovariano não

diferiu entre grupos (Gráf. 1). Em decorrência deste resultado optou-se pela quantificação das estruturas ovarianas somente nos ovários de ratas com sete dias de gestação. A diferença estatística entre os grupos aos sete dias de gestação provavelmente deve ter ocorrido, porque em ratas a secreção de progesterona também é realizada pela placenta até o final da gestação e no terço inicial esta ação ainda estava unicamente sob controle dos corpos lúteos.

Gráfico 1. Peso ovariano (Média ± Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

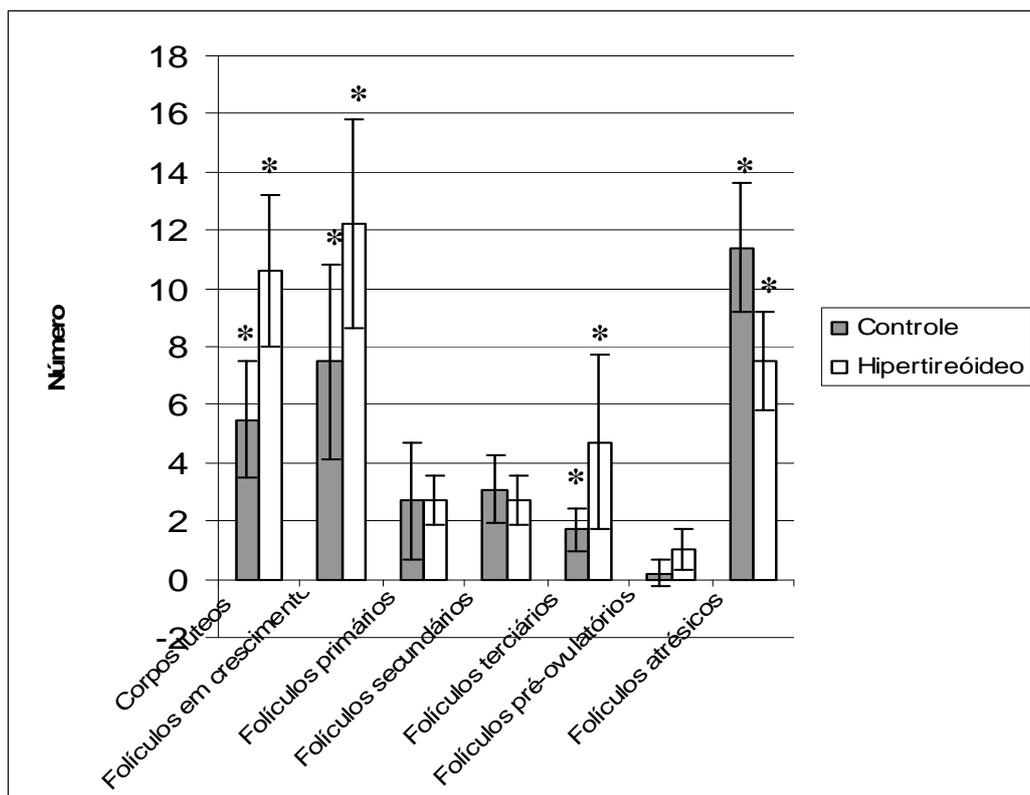


Asterisco indica diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$).

O número de corpos lúteos foi significativamente maior nos ovários das ratas hipertireóideas, caracterizando maior taxa de ovulação nestes animais (Gráf. 2). Além disso, as ratas hipertireóideas apresentaram menor atresia folicular (Gráf. 2) o que também indica que o hipertireoidismo tenha contribuído para o aumento da taxa de ovulação. Resultados similares a esses foram descritos por Serakides et al. (2001). A figura 2 mostra o ovário de ratas hipertireóideas apresentando maior número de corpos lúteos em relação às ratas eutireóideas.

Sendo assim, resta saber se o hipertireoidismo induz aumento da taxa de gestação somente por aumentar a taxa de ovulação ou também por modificar o útero e a placenta na tentativa de permitir que essa gestação seja levada a termo. Muitas vezes, o uso de medicamentos, para aumentar a taxa de ovulação, em fêmeas multíparas não culmina em aumento da taxa de nascimento, pois o útero não se adapta suficientemente para permitir que todos esses fetos sejam levados a termo.

Gráfico 2. Número de corpos lúteos e folículos nos ovários (Média ± Desvio-padrão) do grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete dias de gestação.



Asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$). (Folículos em crescimento = folículos primários + secundários + terciários + pré-ovulatórios).

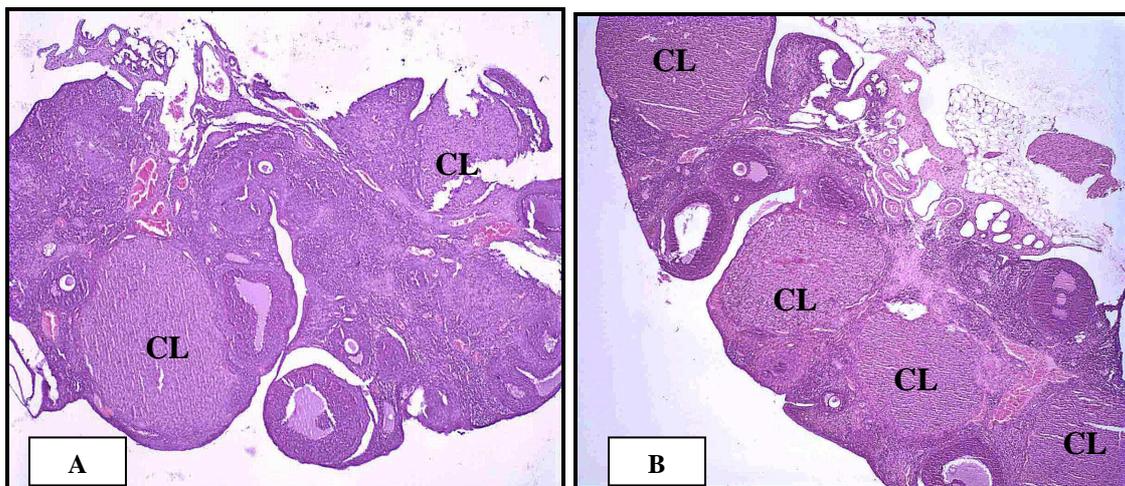


Figura 2. Ovários, rata com sete dias de gestação. HE, 9,1 × A) Grupo controle. B) Grupo hipertireóideo. Ovário com maior número de corpos lúteos (CL) nas ratas hipertireóideas em comparação ao ovário das ratas do grupo controle.

4.1.4. Número total e características fetais

As ratas hipertireóideas apresentaram maior número total de fetos e embriões. Além disso, a porcentagem de embriões e fetos viáveis, embora maior no grupo hipertireóideo, não diferiu significativamente entre grupos (Tab. 4).

Independente do tratamento, aos sete dias de gestação, todos os embriões aparentemente se encontravam viáveis, enquanto que aos 14 e 19 dias de gestação alguns úteros possuíam fetos inviáveis em um ou ambos os cornos. Esse resultado demonstra que tanto as ratas eutireóideas quanto as hipertireóideas apresentaram problemas reprodutivos pequenos e semelhantes. Esse resultado é bastante interessante, pois o hipertireoidismo aumentou significativamente o número de fetos sem reduzir sua viabilidade.

A escolha do sacrifício dos animais aos 19 dias de gestação foi realizada com base em experimentos anteriores que demonstraram que ratas hipertireóideas podem antecipar o momento do parto por um intervalo de

tempo variável (Rosato et al, 1992). Além disso, alguns animais podem cometer canibalismo de seus filhotes no momento do parto ou imediatamente após o parto. Assim, um intervalo de 48 horas antes de completar 21 dias de gestação foi o melhor momento para a realização do sacrifício dos animais, a fim de ter maior confiabilidade do número total de fetos. O ato de canibalismo ao nascimento apesar de ser observado tanto nas ratas eutireóideas quanto nas hipertireóideas, comprometeu a confiabilidade do número de fetos nascidos (Leite, 2006).

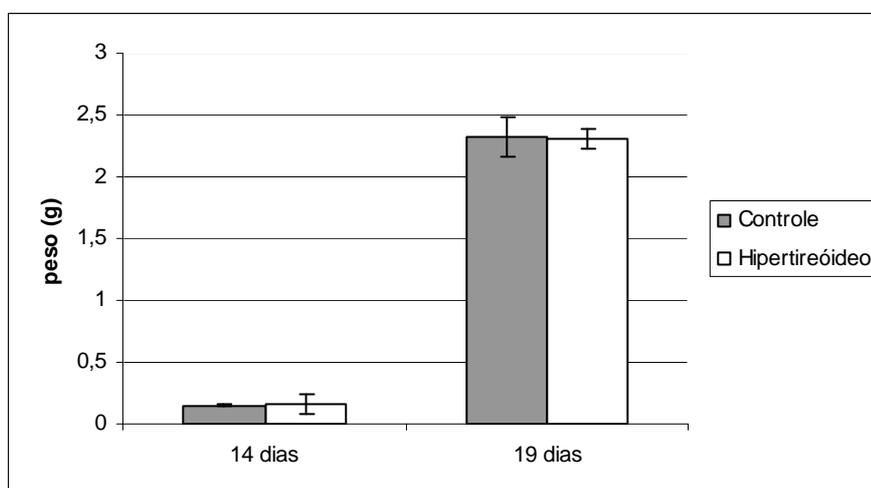
Apesar do útero das ratas gestantes hipertireóideas apresentarem maior número de fetos, o peso individual dos mesmos foi similar àqueles gerados pelas mães eutireóideas (Gráfico 3). Esse resultado é surpreendente, pois mesmo possuindo maior número de fetos, não houve redução compensatória do peso desses animais, indicando assim que as ratas hipertireóideas foram capazes de gerar uma ninhada maior, viável e com peso normal.

Tabela 4. Número total e porcentagem de fetos viáveis (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo.

Variável	Grupo	
	Controle	Hipertireóideo
Número total de fetos	11,47 ± 3,24 B	14,50 ± 2,73 A
Porcentagem de fetos viáveis	84,34 ± 34,89 A	93,43 ± 21,92 A

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

Gráfico 3. Peso individual dos fetos (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.



Com base nesses achados, ficariam algumas indagações importantes, visto que Rosato et al. (1992) observaram que ratas hipertireóideas parem maior número de filhotes, porém até o presente momento ainda não se sabia a razão que contribuiria para tal resultado. Agora já se sabe que a maior taxa de nascimento observada em ratas gestantes hipertireóideas é precedida por aumento na taxa de ovulação, mas ainda restam algumas indagações que serão pesquisadas à frente. Haveria modificações

estruturais das camadas uterinas das ratas hipertireóideas que propiciariam a acomodação de maior quantidade de fetos durante a gestação? Ou seriam as modificações placentárias as principais responsáveis pela permanência e desenvolvimento dos fetos até o final da gestação?

4.1.5. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do útero

O peso uterino diferiu significativamente entre os grupos somente aos 19 dias de gestação (Tab. 5). Essa diferença ocorreu tanto no útero contendo os fetos quanto sem os fetos. No útero com os fetos o aumento no grupo hipertireóideo já seria esperado, uma vez que o número de fetos foi maior

neste grupo. Mas, mesmo com a retirada dos fetos, o peso uterino no grupo hipertireóideo permaneceu elevado aos 19 dias de gestação. Em parte isso poderia ser explicado, pela presença dos anexos placentários em maior quantidade no útero das ratas hipertireóideas. Mas haveria alguma modificação na espessura das camadas uterinas que contribuiria para esse aumento do peso uterino no grupo hipertireóideo?

Tabela 5. Peso uterino (g) (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação

Período gestacional	Grupo Eutireóideo		Grupo Hipertireóideo	
	Peso uterino com fetos	Peso uterino sem fetos	Peso uterino com fetos	Peso uterino sem fetos
7 dias	0,73±0,06 a	-	0,76± 0,12 a	-
14 dias	9,74±2,92 a	7,95 ± 2,29 a	10,87 ± 2,63 a	8,70 ± 2,08 a
19 dias	38,51±14,3 b	16,74 ± 5,65 b	54,89 ± 8,55 a	23,39 ± 3,01 a

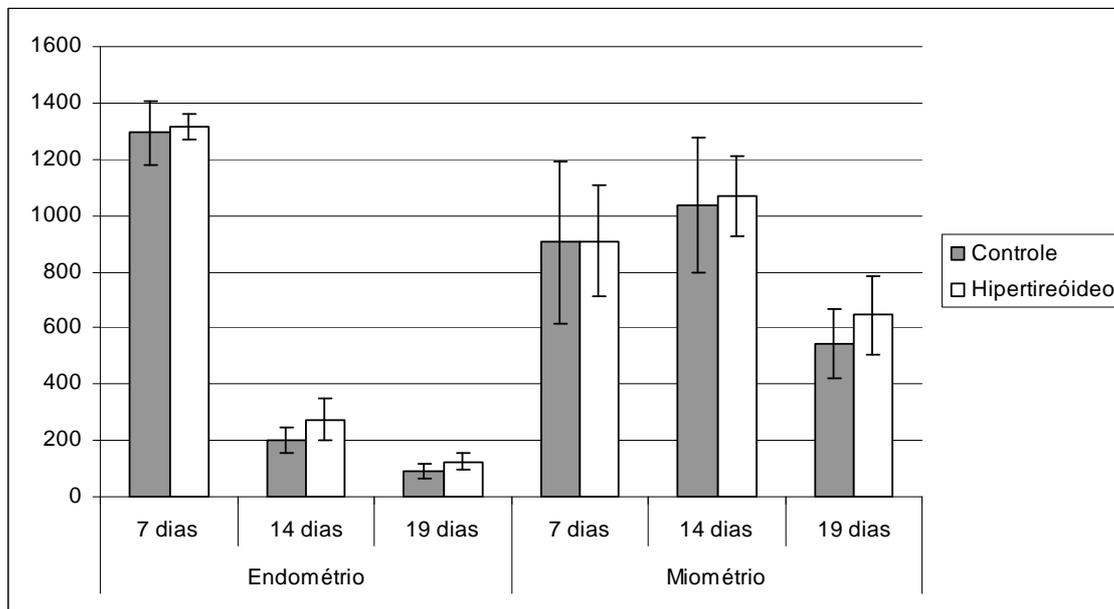
* Médias com letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

No início do experimento, existia a hipótese de que o hipertireoidismo propiciaria ao útero e suas camadas mudanças significativas a fim de proporcionar uma melhoria no ambiente uterino e consequentemente favorecer a implantação e a gestação de maior número de filhotes. No entanto, foi observado que a espessura do endométrio e do miométrio não diferiu entre grupos em nenhum período gestacional (Gráfico 4).

Durante a gestação, as características morfológicas do útero em ambos os grupos se mantiveram similares. No sétimo dia de gestação, o endométrio era espesso e apresentava grande quantidade de glândulas endometriais. As fibras musculares lisas do miométrio eram bem organizadas e

perpendiculares entre si. Aos 14 dias de gestação, o endométrio encontrava-se delgado, com algumas regiões formadas por uma simples camada de epitélio cúbico e as glândulas endometriais eram ausentes ou raras. O miométrio apresentava-se espesso e os feixes musculares ainda obedeciam uma orientação perpendicular entre si. Já aos 19 dias de gestação, o endométrio apresentava-se muito delgado com ausência de glândulas endometriais. O miométrio também era delgado com fibras musculares lisas espaçadas entre si, característica de edema. Também podia ser observada grande quantidade de colágeno entre os feixes musculares.

Gráfico 4. Espessura das camadas uterinas (μm) (Média \pm Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.



Diante dos resultados da avaliação histomorfométrica, ficou comprovado que o útero das ratas hipertireóideas era mais pesado devido ao fato de que essas ratas apresentaram maior número de fetos e conseqüentemente maior quantidade de líquidos e placenta, já que esses últimos foram mantidos *in situ* para análises posteriores e que a espessura das camadas uterinas não contribuíram diretamente para a melhoria no ambiente uterino após a implantação e durante o período gestacional.

Tanto o índice de proliferação celular das camadas uterinas, avaliado por meio da imunomarcagem pelo anticorpo CDC-47, quanto o índice de apoptose celular, utilizando o anticorpo caspase-3, respectivamente, não apresentou diferença significativa entre grupos e períodos (Gráficos 5-6). Esse achado confirma a hipótese de que o útero não sofreu modificação estrutural após a implantação embrionária e durante todo o período gestacional. Sabe-se que os hormônios da

tireóide possuem efeito direto sobre o útero regulando sua responsividade ao estrógeno (Gardner et al., 1978) e que animais hipotireóideos apresentam problemas reprodutivos provavelmente devido à diminuição dessa resposta, o que leva a diminuição da taxa mitótica por parte das células uterinas causando problemas reprodutivos (Kirkland et al, 1981). Por outro lado, também já foi visto que o hipertireoidismo diminui a resposta do útero ao estrógeno durante o desenvolvimento uterino em ratas não gestantes (Cidlowski e Muldoon, 1975). No entanto, não foi observado maior ou menor índice de proliferação celular no útero dos animais hipertireóideos gestantes em nenhum dos períodos avaliados. Além disso, não houve diferença significativa quanto ao índice apoptótico nas camadas uterinas em ambos os grupos, sugerindo que o hipertireoidismo não acelera ou diminui o ciclo celular desses tecidos durante a gestação.

Gráfico 5. Número de células/campo com expressão de CDC-47 nas camadas uterinas (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

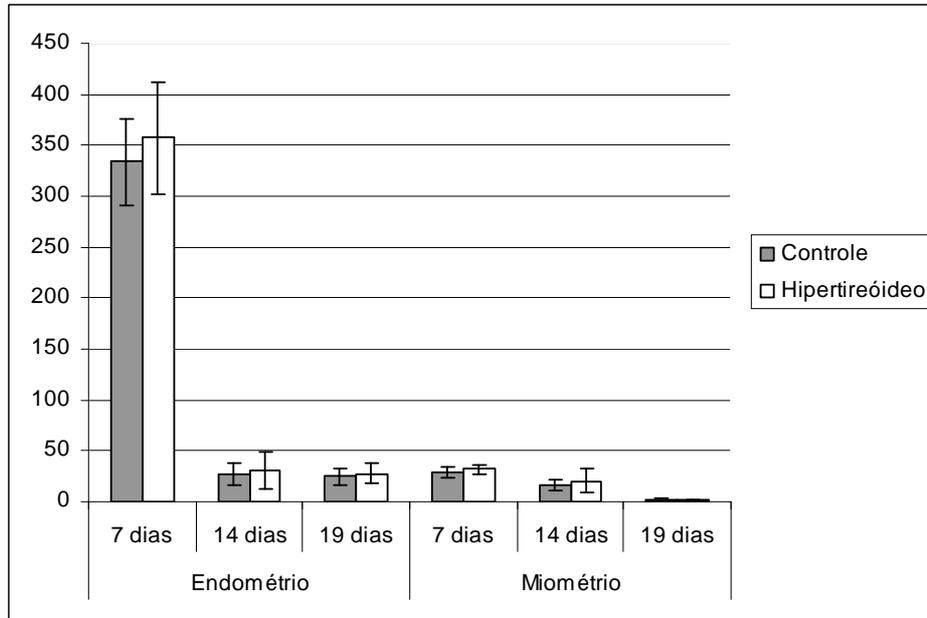
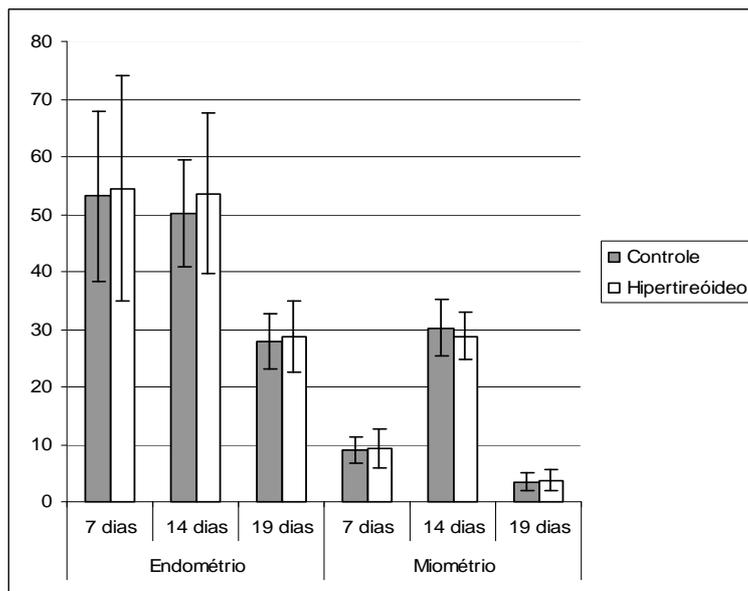


Gráfico 6. Número de células/campo com expressão de caspase-3 nas camadas uterinas (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete, 14 e 19 dias de gestação.



4.1.6. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do trofoblasto

As células trofoblásticas, avaliadas aos sete dias de gestação, do grupo hipertireóideo eram poligonais, volumosas, apresentando citoplasma com bordas pouco definidas, núcleo grande, com um ou dois nucléolos proeminentes (Fig. 3A) e às vezes apresentando várias figuras de mitose por campo. No grupo controle essas células eram predominantemente arredondadas, com bordas citoplasmáticas pouco definidas e com núcleo menor (Fig. 3B). A avaliação morfométrica comprovou que as células trofoblásticas nas ratas gestantes hipertireóideas apresentavam núcleos significativamente maiores. No entanto, não houve diferença entre grupos com relação à taxa de proliferação e de apoptose dessas células (Tab. 6, Fig. 3C e 3D). Esses achados indicam que as células trofoblásticas do grupo hipertireóideo

apresentavam metabolicamente mais ativas quando comparadas às do grupo eutireóideo. O trofoblasto é o primeiro epitélio polarizado a aparecer durante o desenvolvimento do mamífero. Ele não contribui para a formação de nenhum tecido fetal, porém contribui para a formação da placenta e das membranas extra-embrionárias. O feto é derivado de um agrupamento de células não polares, pluripotentes situadas excentricamente no interior do blastocisto denominado massa celular interna (Armant, 2005). Durante a implantação, os componentes da massa celular interna e o trofoblasto polar (porção que não teve contato com o endométrio) se desenvolvem no ectoderma extra-embrionário e no cone ectoplacentário, respectivamente (Adamson et al, 2002). A diferenciação trofoblástica produz diferentes subtipos celulares com funções endócrina, vascular, imunológica e de transporte que fazem parte do disco placentário que será estudado a seguir.

Tabela 6. Diâmetro nuclear médio das células trofoblásticas e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos sete dias de gestação.

Variável	Grupo	
	Eutireóideo (n=6)	Hipertireóideo (n=6)
Diâmetro nuclear (µm)	9,95±1,22 B	12,69±1,68 A
Células/campo com expressão de CDC-47	212,67±55,36 A	290,67±34,98 A
Células/campo com expressão de caspase-3	14,67±1,86 A	12,67±1,75 A

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

4.1.7. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do disco placentário

O efeito do hipertireoidismo na histomorfometria e na taxa de proliferação e de apoptose das camadas do disco placentário (labirinto placentário,

espongiotrofoblasto, células gigantes trofoblásticas) também foi investigado. O disco placentário corresponde a maior parte da placenta dos roedores e suas camadas estão envolvidas em todos os processos materno-fetais durante a gestação (Kauffmann e Burton, 1994).

O disco é constituído por três camadas: da superfície fetal o tecido conjuntivo córion-alantóide estende-se para dentro do labirinto placentário que compreende a maior porção do disco, seguido pela camada intermediária denominada espongiotrofoblasto e, na base, é formado por uma camada de células gigantes que se interdigital com a decídua (Fig. 4A). Não foram observadas diferenças entre grupos com relação à morfologia das camadas do disco placentário. O labirinto apresentava finos capilares fetais sustentados por pequena quantidade de tecido conjuntivo e rodeados por células trofoblásticas alongadas ou ovóides (Fig. 4B). Observou-se ainda nessa camada a barreira fetal/materna, composta por capilares fetais, contendo hemácias nucleadas, separados pelas células trofoblásticas. Já a camada de células citotrofoblásticas apresentava-se constituída por células trofoblásticas bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com borda celular distinta, citoplasma escasso, claro ou eosinofílico e com nucléolo único vesicular (Fig. 4C). A camada de células gigantes trofoblásticas apresentava-se mais delgada que a camada de espongiotrofoblastos, era composta por células fundidas que compartilhavam o mesmo citoplasma, ora eosinofílico ora basofílico e frequentemente continham múltiplos vacúolos, formando uma massa plasmodial semeada de núcleos (sincício) (Fig. 4D). Essa camada se fundia com a decídua e com o miométrio, em menor grau.

A fim de observar o desenvolvimento do disco placentário foi realizada a mensuração do diâmetro médio dos discos placentários de todos os cornos uterinos de todas as ratas e não se observou diferença significativa entre grupos aos 14 e 19 dias de gestação (Tab. 7). Da mesma forma, a mensuração da espessura tanto do labirinto placentário quanto da camada de células gigantes trofoblásticas (espongiotrofoblasto) não diferiu entre grupos (Tab. 8 e 9). No entanto, a camada do espongiotrofoblasto foi

significativamente mais espessa nas ratas gestantes hipertireóideas aos 14 dias de gestação (Gráf. 7 e Fig. 5A e 5B).

As células citotrofoblásticas desempenham funções essenciais à vida fetal principalmente no início da gestação. Essas células são consideradas a maior fonte de hormônios luteotróficos e lactogênicos da família dos hormônios estruturalmente relacionados à prolactina hipofisária (PRL) (Rasmussen et al., 1997; Soares et al., 1998). Esses hormônios são responsáveis pela manutenção da gestação devido à ação da progesterona (Weitlauf, 1994; Soares et al., 1998) e são responsáveis pela produção da proteína A semelhante à prolactina (PLP-A) que promove a ativação de linfócitos uterinos (Muller et al., 1999). Os linfócitos são células de defesa residentes do útero de roedores e humanos durante a gestação que reconhecem e eliminam células infectadas por vírus e células modificadas, e ainda secretam moléculas bioefetoras (Whitelaw e Croy, 1996). É provável que não tenha havido diferença significativa da espessura da camada de espongiotrofoblasto entre grupos aos 19 dias de gestação, porque essas funções tornam-se menos necessárias à vida fetal na gestação avançada. Além disso, a redução da espessura dessa camada, assim como o espaçamento das suas células no final da gestação é importante na transferência materno-fetal de imunoglobulinas (Kauffmann e Burton, 1994).

As células citotrofoblásticas da placenta das ratas hipertireóideas apresentaram taxa de proliferação significativamente mais elevada aos 14 dias de gestação caracterizada pela maior expressão de CDC-47 em comparação ao grupo controle (Gráf. 7 e Fig. 5C e 5D). Isso explica o aumento da espessura desta camada. As células citotrofoblásticas são derivadas de células precursoras que residem no cone ectoplacentário e proliferam como resultado de endoreduplicação (Cross, 2000), sugerindo assim que os hormônios

tireoidianos influenciam de alguma forma no maior recrutamento e proliferação dessas células. Apesar de haver maior taxa de proliferação nessa camada, não foi observada diferença significativa quanto ao taxa apoptótica entre os grupos (Gráf. 7).

A camada de sinciciotrofoblasto tende a regredir à medida que a gestação progride restando uma simples camada de células gigantes trofoblásticas sobre a lâmina basal, sugerindo que as funções dessas células são mais requeridas até o terço médio do período gestacional. Mitoses nunca são observadas numa célula sincicial e a manutenção dessa

camada é dependente da incorporação contínua das células citotrofoblásticas (Kaufmann e Burton, 1994). Por essa razão, a quantificação da taxa de proliferação celular não foi realizada nessa camada devido à ausência de imunomarcagem pelo anticorpo CDC-47. Esse achado é interessante, pois mesmo sob efeito dos hormônios tireoidianos essas células não apresentaram atividade proliferativa (Fig. 6A e 6B). A regressão da camada de células gigantes trofoblásticas se dá principalmente por apoptose, entretanto em ambos os grupos o índice apoptótico foi semelhante (Tab. 9).

Tabela 7. Diâmetro médio do disco placentário (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.

Grupo	Diâmetro médio do disco placentário (µm)	
	14 dias	19 dias
Controle	4652,5±361,46 Ba	5620,83±443,35 Aa
Hipertireóideo	4680,0±39,2 Ba	5660,00±695,66 Aa

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

Tabela 8. Espessura do labirinto placentário e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.

Variável	Grupo			
	Controle		Hipertireóideo	
	14 dias	19 dias	14 dias	19 dias
Espessura (µm)	1150±243 B	2510±440 A	1380±220 B	2560±255 A
Número de células/campo com expressão de CDC-47	329±25,78 A	247,5±36,23 B	343,8±55,03 A	272,8±44,38 B
Número de células/campo com expressão de caspase-3	5,8±1,48 A	13,67±1,63 B	5,2±1,92 A	13,8±1,3 B

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

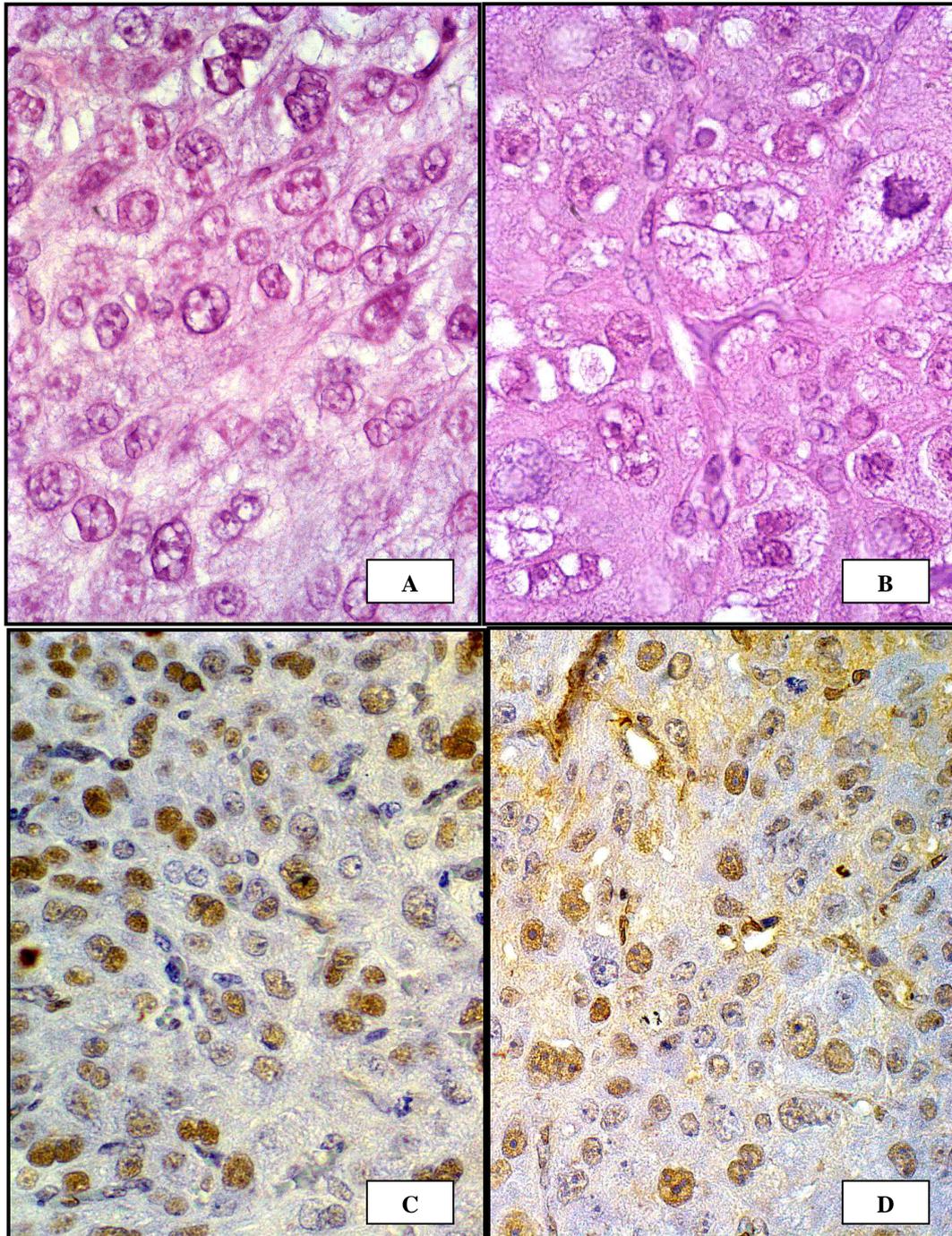


Figura 3A. Trofoblasto, rata com sete dias de gestação. Grupo controle. HE, 260×. Figura 3B) Trofoblasto, rata com sete dias de gestação. Grupo hipertireóideo. HE, 257,1×. Células trofoblásticas com núcleo vesiculoso, mais volumoso em comparação às células trofoblásticas das ratas eutireóideas e com citoplasma grumoso. Figura 3C) Imunomarcção para CDC-47, Grupo controle. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 102,86×. Figura 3D) Imunomarcção para CDC-47, Grupo hipertireóideo com imunomarcção semelhante ao eutireóideo. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 102,86×. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom.

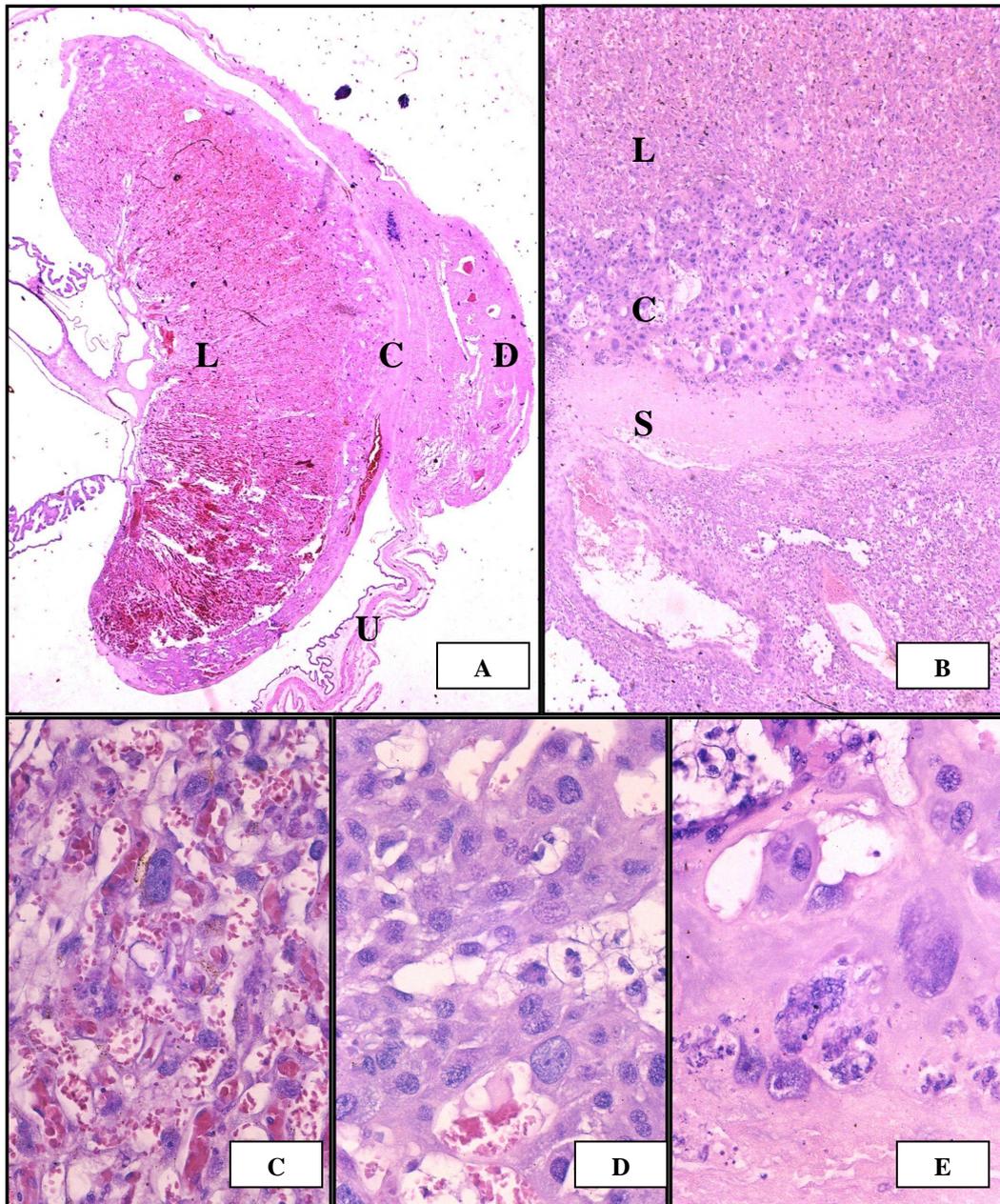


Figura 4. Rata , grupo controle, disco placentário, 19 dias de gestação. HE. A) Corte transversal do disco placentário com espongiotrofoblasto (C), labirinto placentário (L), decídua (D) e útero (U). 8,9×. B) Detalhe das camadas de sinciotrofoblasto (S), espongiotrofoblasto (C) e labirinto placentário (L). 28,57×. C) labirinto com finos capilares fetais sustentados por pequena quantidade de tecido conjuntivo e rodeados por células trofoblásticas alongadas ou ovóides. 194,29×. D) Camada de células citotrofoblásticas constituída por células bem individualizadas, pequenas, redondas, mononucleares com citoplasma escasso. 194,29×. E) Camada do sinciotrofoblasto delgada e composta por células fundidas que compartilhavam o mesmo citoplasma, ora eosinófilico ora basófilico.

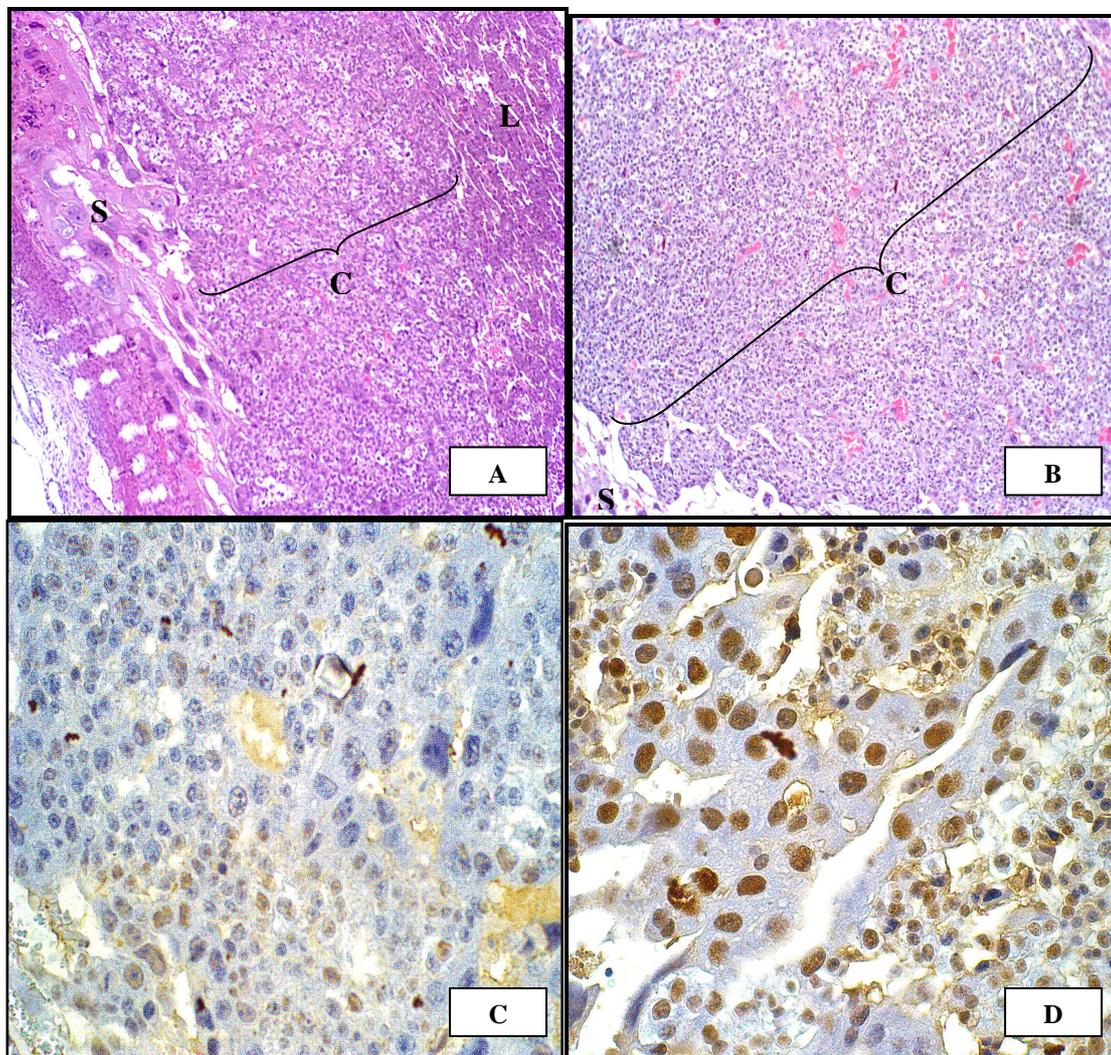


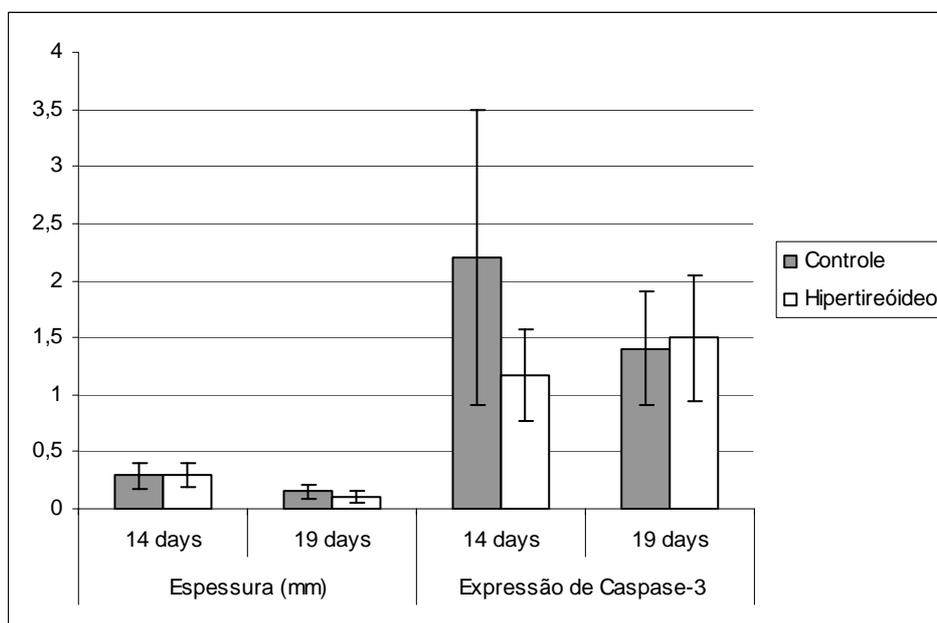
Figura 5. Rata, disco placentário, 14 dias de gestação. A e B) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Camada de espongiotrofoblasto mais espessa no grupo hipertireóideo. HE, 20×. C e D) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Maior expressão de CDC-47 nas células citotrofoblásticas do grupo hipertireóideo em comparação ao eutireóideo. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 72×. S: sinciotrofoblasto, C: espongiotrofoblasto e L: labirinto placentário. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom.

Tabela 9. Espessura do espongiotrofoblasto e do número de células/campo com expressão de CDC-47 e de caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.

Variável	Grupo			
	Controle		Hipertireóideo	
	14 dias	19 dias	14 dias	19 dias
Espessura (µm)	780±170 B	530±120 C	1020±170 A	600±80 C
Número de células/campo com expressão de CDC-47	146,8± 24,67 B	86,17±6,49 C	209,2±25,88 A	87,2±3,96 C
Número de células/campo com expressão de caspase-3	1,2±0,83 A	0,83 ±0,75 A	1,2±0,83 A	1±0,71 A

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

Gráfico 7. Espessura da camada de células gigantes trofoblásticas e do número de células/campo com expressão de caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo aos 14 e 19 dias de gestação.



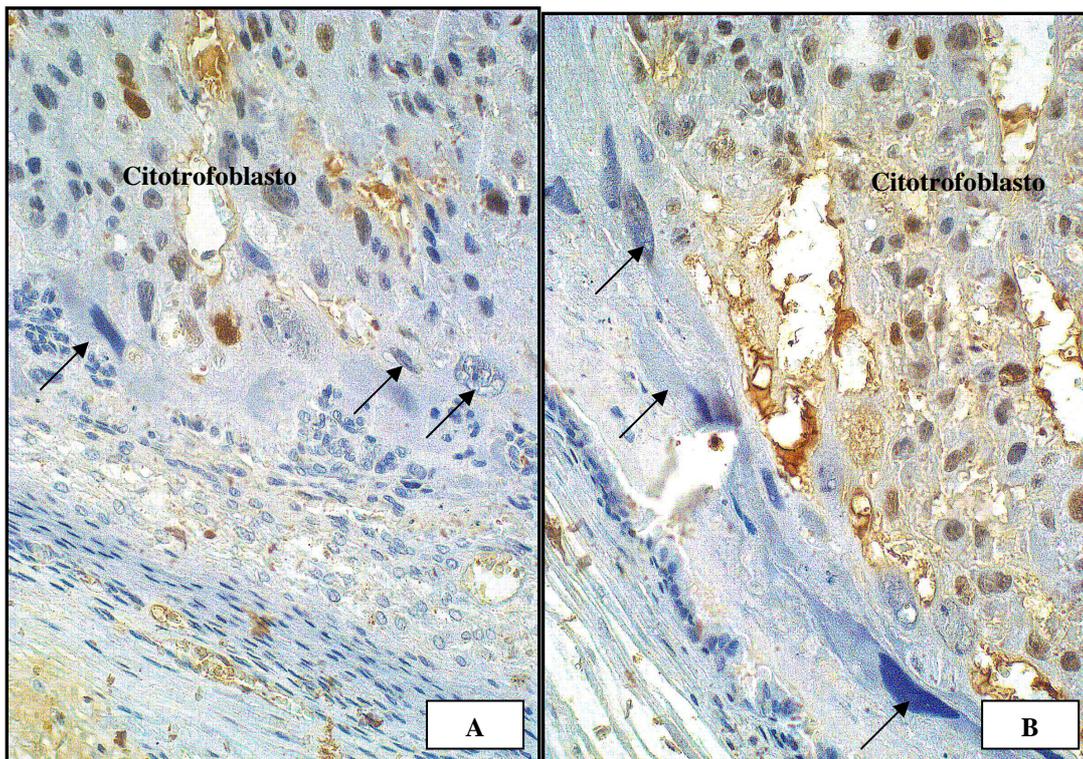


Figura 6. Rata, disco placentário, 14 dias de gestação. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 114,28×. A e B) Grupos controle e hipertireóide, respectivamente. Camada de sinciotrofoblasto com células sem expressão de CDC-47 em ambos os grupos (setas).

4.2. Experimento 2

4.2.1. Indução ao hipertireoidismo

A partir do consumo médio de água ingerido por animal, por dia, estimou-se que a dose diária de tiroxina ingerida por animal foi de $60,43\mu\text{g} \pm 8,82$, durante a indução e de $39,72\mu\text{g} \pm 8,85$, durante a gestação e lactação. Como descrito anteriormente, apenas 70 a 80% da tiroxina, administrada por via oral é absorvida (Nobre et al, 2004), ou seja, é provável que a dose mínima de tiroxina absorvida tenha sido de $42,3\mu\text{g}$ durante o período de indução e de $27,8\mu\text{g}$ durante a gestação e a lactação. Varas et al. (2002) utilizando uma dose de $20\mu\text{g}$ de tiroxina/animal/dia conseguiu induzir satisfatoriamente o hipertireoidismo.

Em comparação ao primeiro experimento, foi realizada uma redução de aproximadamente 32,85% na dose de tiroxina durante a indução e, posteriormente, de aproximadamente 52,14% durante a gestação e lactação. Esta redução foi realizada com o objetivo de se evitar a morte dos filhotes por uma overdose de tiroxina, via leite, como ocorreu no experimento de Rosato et al. (1992), em que os filhotes morreram dentro de 48 horas pós-parto.

Mas, como pode ser visto na tabela 10, a altura do epitélio folicular nas ratas tratadas com tiroxina não diferiu significativamente das ratas eutireóideas. A falta de diferença significativa na altura do epitélio das ratas hipertireóideas em comparação ao das ratas eutireóideas pode ser explicado pelo fato de

que a lactação por si só reduz significativamente a altura do epitélio folicular (Miranda et al., 2001). Dessa forma, ao contrário do que ocorreu na gestação, não foi possível demonstrar durante a lactação o abaixamento do epitélio folicular como consequência do efeito de *feedback* negativo da tiroxina administrada sobre a tireóide. Além disso, não foi observado aumento no consumo de água e

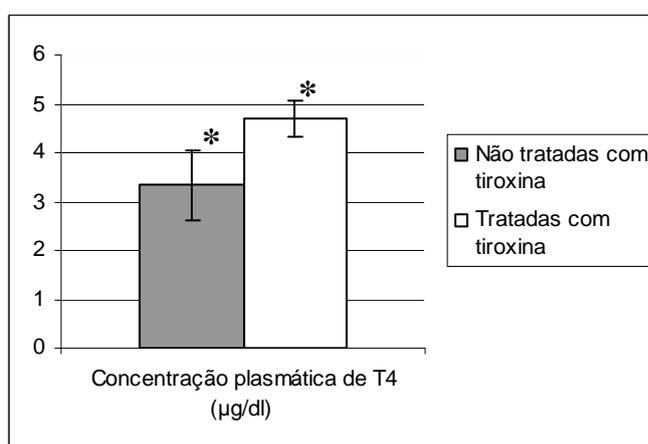
de alimentos e alterações comportamentais tão significativas como no primeiro experimento. Por todas essas razões, foi realizada a dosagem de T4 total plasmática de todas as ratas, o que comprovou a indução de hipertireoidismo naqueles animais tratados com tiroxina (Gráf. 8) e, por isso, daqui por diante o grupo de ratas tratadas será denominado hipertireóide.

Tabela 10. Altura média do epitélio folicular das tireóides (Média ± Desvio-padrão) em ratas tratadas com tiroxina e não tratadas no segundo dia após o parto

Grupo	Altura do epitélio folicular (µm)
Não tratadas	4,9±1,03 a
Tratadas	5,06±0,53 a

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

Gráfico 8. Concentração plasmática de T4 (µg/dl) (Média ± Desvio-padrão) em ratas tratadas com tiroxina e não tratadas no segundo dia após o parto.



Asterisco indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4.2.2. Histomorfometria ovariana

De acordo com a tabela 11, não foi observada diferença quanto ao peso dos ovários entre os grupos após dois dias do parto. Tanto no grupo hipertireóideo quanto no grupo controle, foi observado predomínio de corpos lúteos em regressão e alguns folículos terciários, assim como secundários e primários, além de folículos atrésicos. Por essa razão não foi realizada a contagem das

estruturas ovarianas nesse experimento. Após o parto seria esperado que os hormônios tireoidianos agissem sobre o ovário acelerando o recrutamento de novos folículos terciários mais rapidamente, porém aparentemente isso não ocorreu porque a análise foi realizada nos ovários dois dias após o parto, tempo insuficiente para que essas alterações ocorressem.

Tabela 11. Peso médio dos ovários (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto

Grupo	Peso médio dos ovários (g)
Controle	0,06 ± 0,010 a
Hipertireóideo	0,06 ± 0,010 a

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

4.2.3. Avaliação histomorfométrica e imunoistoquímica do útero em involução

Morfologicamente, os sítios de inserção placentária nos animais controles aparentemente apresentavam diâmetro médio maior do que os animais

hipertireóideos, apresentavam-se mais celularizados, além de apresentarem-se mais hemorrágicos (Fig. 7). No entanto, apesar dessas diferenças morfológicas, não houve, entre grupos, diferença significativa do diâmetro médio dos discos placentários (Tab. 12).

Tabela 12. Diâmetro dos sítios de inserção placentária e peso uterino (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto

Variável	Grupo	
	Controle	Hipertireóideo
Diâmetro do sítio de inserção placentária (μm)	2372,92±657,48 a	1920,83±121,88 a
Peso uterino (g)	1,80 ± 0,16 a	1,79 ± 0,33 a

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

De uma maneira geral, os sítios de inserção placentária em involução constituíam-se de um arranjo de células necróticas, apoptóticas e, ao mesmo tempo, em proliferação situadas no endométrio. Esse arranjo era composto por células do próprio disco placentário, por células trofoblásticas e deciduais ora degeneradas ou necróticas ora apoptóticas. Além dessas células, também foi visualizada grande quantidade de fibroblastos em proliferação, intenso infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos, extensas áreas de hemorragia e trombos. Desta forma, optou-se por não realizar a análise do índice apoptótico e de proliferação celular devido à miscelânea de diversos tipos celulares encontrados nos sítios de inserção placentária, o que poderia gerar dúvidas quanto à individualização e identificação de algumas células.

Em ambos os grupos, as características morfológicas das camadas uterinas apresentavam algumas semelhanças entre os grupos. O endométrio apresentava-se novamente mais espesso e com grande quantidade de glândulas endometriais. No miométrio, podia observar claramente a reorganização das fibras musculares lisas, no entanto, essas ainda não obedeciam um padrão de orientação perpendicular. O perimétrio era formado por tecido conjuntivo frouxo com ocasionais células musculares lisas e apresentava-se, em certas áreas, em forma de pregas. Mas, o número de células apoptóticas no grupo hipertireóideo foi menor com maior número de células em proliferação em todas as camadas uterinas.

Apesar de não ter ocorrido diferença no peso e na espessura dessas camadas, tanto o

índice de proliferação quanto o apoptótico diferiram significativamente entre os grupos (Tab. 13 e 14). Enquanto no grupo controle o índice de proliferação celular nas camadas uterinas foi menor (Fig. 8), o índice apoptótico foi maior quando comparado ao grupo hipertireóideo (Fig. 9). Esse resultado sugere que o hipertireoidismo acelera a involução uterina apesar de não haver diferença na espessura das camadas uterinas.

Os hormônios da tireóide desempenham importante papel no processo de proliferação e morte celular por apoptose. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a 3,5,3'-triiodotironina (T3) induz, simultaneamente, diferentes caminhos que causam proliferação ou apoptose de células epiteliais (Su et al., 1997). Estudos demonstram, ainda, que a T3 está envolvida na morfogênese em anfíbios por ambos os processos de proliferação e apoptose celular (Shi et al., 1998). O tratamento com T3 no lobo óptico de embriões de frangos mostrou que esse hormônio possui um mecanismo homeostático que equilibra a taxa de proliferação e de morte celular (Ghorbel et al., 1997). Em ratos, o transplante de hepatócitos, seguido do tratamento com T3 aumentou o número dessas células progressivamente repopularizando 60 a 80% da massa parenquimal celular em 60 dias (Oren et al., 1999). Vários estudos têm verificado a participação de alguns hormônios não tireoidianos no processo de involução uterina dos animais (Geyer et al., 1982; Takamoto e Leppert, 1998; Woessner Jr., 1979; Halme e Woessner Jr., 1975; Adams e Frieden, 1985). Porém, em toda a literatura consultada não foi encontrado nenhum relato sobre a ação dos hormônios tireoidianos na involução uterina.

Tabela 13. Espessura endometrial e número de células/campo com expressão de CDC-47 e caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto

Variável	Grupo	
	Controle	Hipertireóideo
Espessura (µm)	1043,50 ± 251,05A	983,88± 417,32 A
Número de células/campo com expressão de CDC-47	177,2±47,99 B	247,5±53,58 A
Número de células/campo com expressão de caspase-3	180,2±13,44 A	164,33±9,81B

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

Tabela 14. Espessura miometrial e número de células/campo com expressão de CDC-47 e caspase-3 (Média ± Desvio-padrão) no grupo controle e grupo hipertireóideo no segundo dia após o parto

Variável	Grupo	
	Controle	Hipertireóideo
Espessura (µm)	2450 ± 434,12 A	2433,30 ± 336,27 A
Número de células/campo com expressão de CDC-47	31,83±2,56 B	35,5±3,08 A
Número de células/campo com expressão de caspase-3	25,6±2,88 A	16,17±3,19 B

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

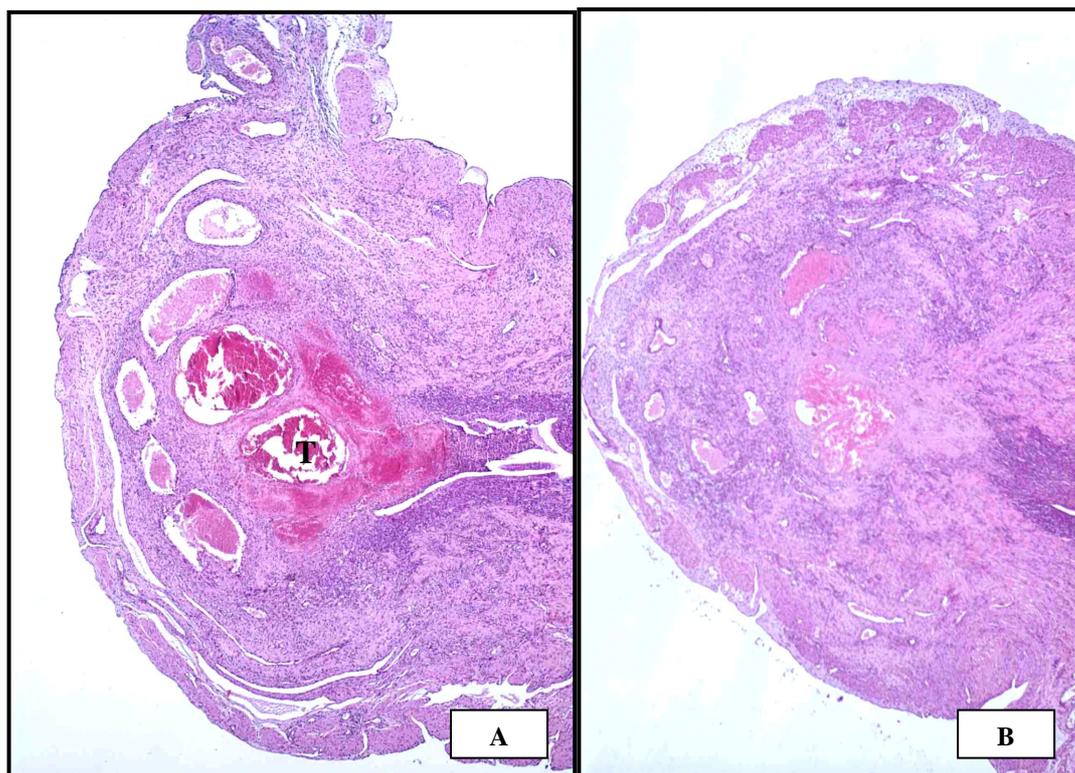


Figura 7. Rata, dois dias pós-parto, sítio de inserção placentária. HE, 11,54×. A e B) Grupos controle e hipertireóideo, respectivamente. Sítio de inserção placentária no grupo controle com diâmetro aparentemente maior quando comparado ao grupo hipertireóideo e com áreas de hemorragia e formações de trombos (T).

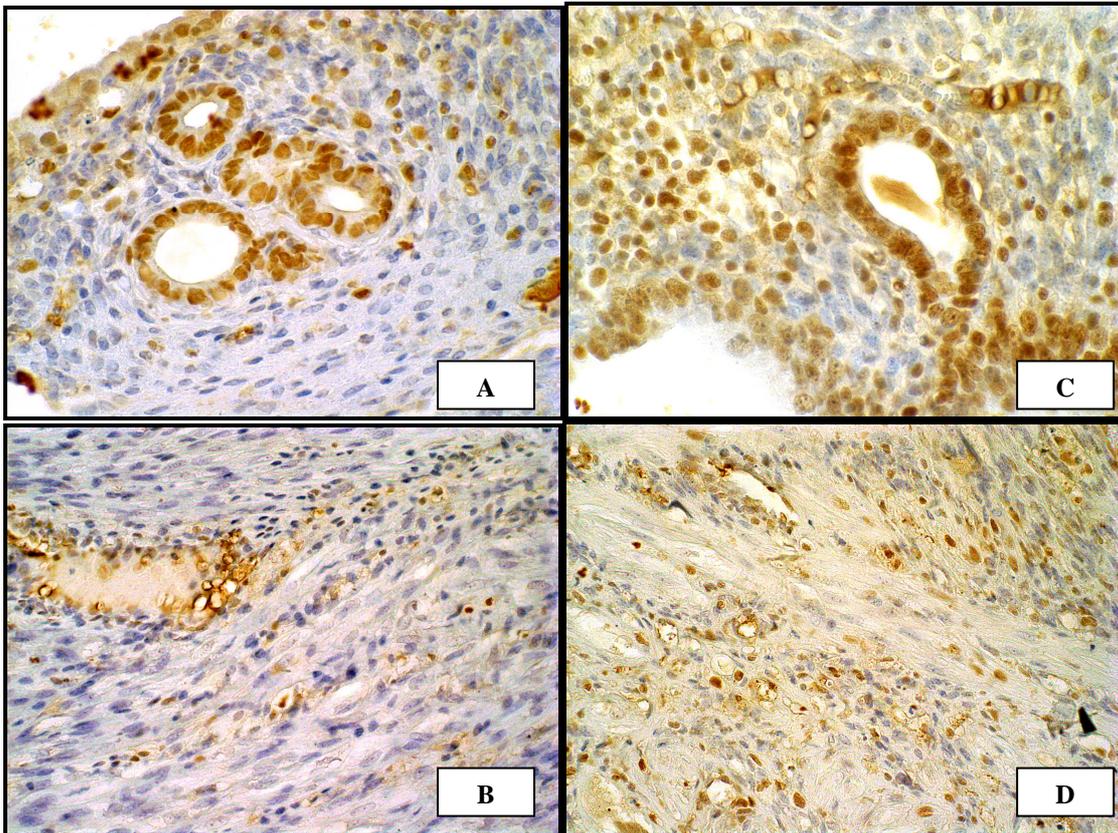


Figura 8. Rata, dois dias pós-parto, útero em involução. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 88 \times . A e B) Grupo controle. Endométrio e miométrio, respectivamente com poucas células com expressão de CDC-47. C e D) Grupo hipertireóideo. Endométrio e miométrio, respectivamente com muitas células com expressão de CDC-47. As células imunomarcadas pelo anticorpo CDC-47 apresentam núcleos corados em marrom.

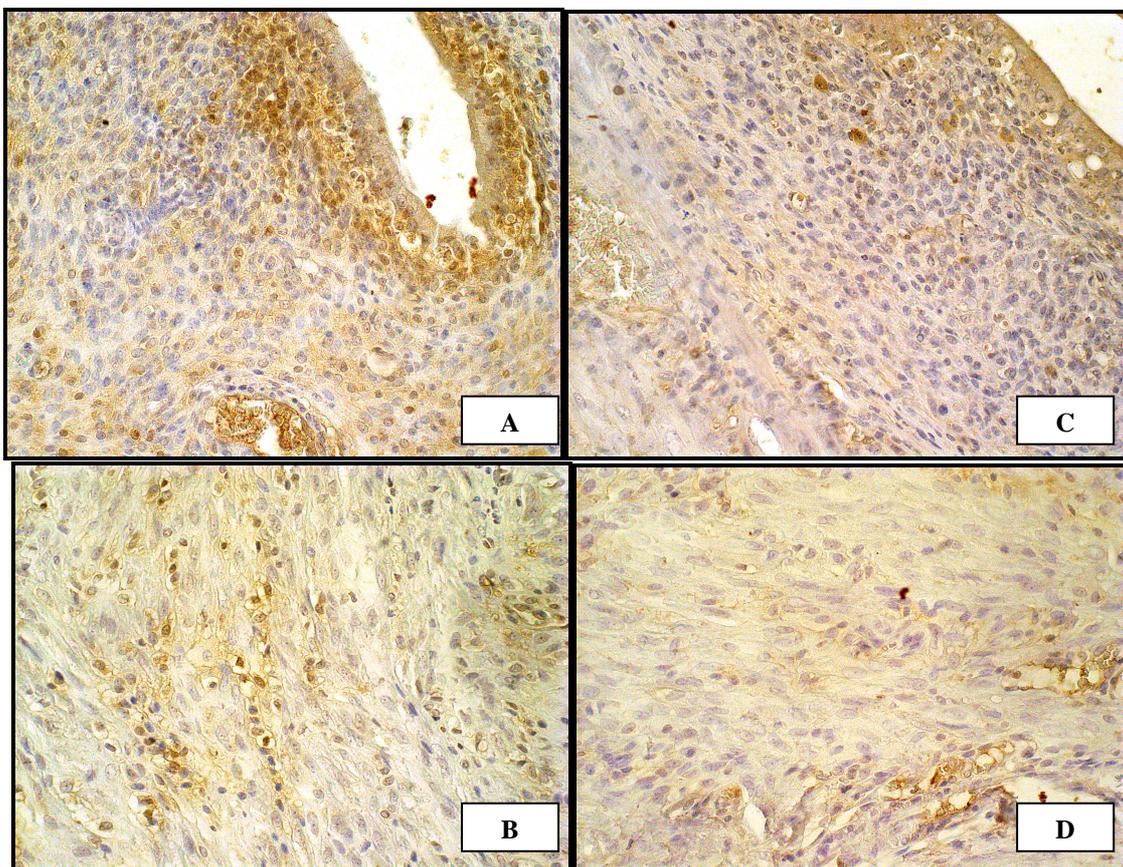


Figura 9. Rata, dois dias pós-parto, útero em involução. Estreptavidina-biotina-peroxidase, contra-coloração por hematoxilina de Harris, 88 \times . A e B) Grupo controle. Endométrio e miométrio, respectivamente com muitas células com expressão de caspase-3. C e D) Grupo hipertireóideo. Endométrio e miométrio, respectivamente com pequeno número de células com expressão de caspase-3. As células imunomarcadas pela caspase-3 apresentam núcleo e/ou citoplasma corados em marrom.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hipertireoidismo é uma das endocrinopatias que mais acomete a mulher, no entanto, pouco se sabe sobre as alterações que ocorrem no útero e na placenta de fêmeas gestantes com hiperfunção tireoidiana. Este estudo inédito até o momento sugere responder a diversos questionamentos no que diz respeito às mudanças que porventura ocorrem no ambiente uterino e na placenta após a implantação do embrião e por todo o período gestacional e pós-parto.

Já se tem conhecimento de que ratas hipertireóideas parem maior número de filhotes (Rosato et al., 1992), porém nenhum estudo havia sido realizado para comprovar qual seria o fator determinante do aumento da taxa de gestação em fêmeas hipertireóideas multíparas. No presente estudo, o hipertireoidismo não somente aumentou o número de fetos e embriões, como também aumentou a taxa de ovulação. Surpreendente e diferentemente do que se postulava no início, não houve nenhuma modificação uterina para dar maior suporte ao aumento do número de fetos. Mas não foi possível responder se haveria mudanças uterinas estruturais que propiciariam a implantação de maior número de embriões. No presente estudo a avaliação do útero foi realizada somente após a implantação dos embriões ao endométrio, ou seja, após a decidualização. Portanto, se ocorreu alguma modificação uterina antes da implantação, isso não pôde ser avaliado. Seria interessante, se novos estudos fossem realizados para responder esta questão, já que há relato de que ratas não gestantes hipertireóideas apresentam modificações uterinas significativas que indicam uma melhoria no ambiente uterino (Oliveira et al., 2005). Resta saber se essas modificações uterinas permaneceriam até o momento da implantação embrionária.

Mas, de posse dos resultados da avaliação uterina, restava saber ainda se a placenta seria a responsável para a manutenção de maior número de fetos no útero, já que, estruturalmente, o ambiente uterino não foi modificado. E assim, foi observado que o hipertireoidismo modifica significativamente tanto o trofoblasto quanto o espongiotrofoblasto. Sabe-se que as células citotrofoblásticas desempenham funções essenciais à vida fetal, principalmente no início da gestação. Essas células produzem hormônios luteotróficos e lactogênicos (Rasmussen et al., 1997; Soares et al., 1998) que também são responsáveis pela manutenção da gestação (Weitlauf, 1994; Soares et al., 1998) e ativam os linfócitos uterinas (Muller et al., 1999), células de defesa que reconhecem e eliminam células infectadas por vírus e células modificadas durante a gestação (Whitelaw e Croy, 1996). É provável que a modificação induzida pelo hipertireoidismo na camada de espongiotrofoblasto seja a principal responsável para que um maior número de fetos viáveis e com desenvolvimento normal sejam levados a termo.

Também foi observado, neste estudo que no pós-parto o hipertireoidismo, apesar de não ter modificado estruturalmente as camadas uterinas durante a involução, aumentou significativamente a taxa de proliferação celular e reduziu a taxa de apoptose no endométrio e miométrio, o que sugere que o hipertireoidismo acelera a involução uterina. Além do mais, apesar de não ter diferença significativa do tamanho do útero e do diâmetro médio dos discos placentários dois dias após o parto, as modificações morfológicas ocorridas no disco das ratas hipertireóideas também corroboram para sugerir que o hipertireoidismo acelera o processo de involução uterina.

6. CONCLUSÕES

6.1. O hipertireoidismo experimental, em ratas gestantes, aumenta a taxa de ovulação e de concepção, sem modificar o desenvolvimento e viabilidade fetal.

6.2. O hipertireoidismo experimental não modifica significativamente a espessura das camadas uterinas e a taxa de proliferação e apoptose dessas camadas durante a gestação.

6.3 O hipertireoidismo experimental modifica significativamente alguns constituintes placentários. Aumenta o diâmetro médio do núcleo das células

trofoblásticas aos sete dias de gestação e aumenta a espessura e a taxa de proliferação da camada do espongiotrofoblasto aos 14 dias de gestação. Mas, não altera a morfologia e as taxas de apoptose e proliferação celular nas camadas do labirinto placentário e de células gigantes trofoblásticas .

6.4 Dois dias após o parto o hipertireoidismo experimental não modifica o peso uterino nem o diâmetro dos discos placentários, mas reduz as alterações circulatórias no disco.

6.5 Ao contrário do que ocorre no período gestacional, o hipertireoidismo experimental aumenta a taxa de proliferação celular e reduz a taxa de apoptose no endométrio e miométrio dois dias após o parto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS W.C.; FRIEDEN, E.H. Inhibition of postpartum uterine involution in the rat by relaxin. *Biol. Reprod.*, v.33, p.1168-1175, 1985.
- ADAMSON, S. L.; LU, Y.; WHITELEY, K. J. et al. Interactions between trophoblast cells and the material and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, v.250, p.358-373, 2002.
- AFLALO, E.D.; SOD-MORIAH, U.A.; POTASHNIK, G. et al. Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.3, p. 7, 2005.
- AKCALI, K.C.; GIBORI, G.; KHAN, S.A. The involvement of apoptotic regulators during *in vitro* decidualization. *Eur. J. Endocrinol.*, v.149, p.69-75, 2003.
- ANDERSON, J. N.; PECK, E. J.; CLARK, J. H. Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinol.*, v.96, p.160-166, 1975.
- ARMANDA-DIAS, L., CARVALHO, J. J., BREITENBACH, M. M. D. et al. Is the infertility in hypothyroidism mainly due to ovariano or pituitary functional changes? *Brazil. J. Med. Biol.Res.*, v.34, p.1209-1215, 2001.
- ARMANT, D.R. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Develop. Biol.*, v.280, p.260-280, 2005.
- BANKS, W. J. *Applied Veterinary Histology. Female Reproductive System.* 3 ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1993. Cap. 27, p. 446-468.
- BASAK, S.; DHAR, R.; DAS, C. Steroids modulate the expression of $\alpha 4$ integrin in mouse blastocysts and uterus during implantation. *Biol.Reprod.*, v.66, p.1784-1789, 2002.
- BISHOP, D. W. *Sperm physiology in relation to the oviduct.* In: HAFEZ, E. S. E.; BLANDAU, R. J. The mammalian oviduct: comparative biology and methodology. Chicago: University of Chicago Press, 1969. cap. 9, p. 231-250.
- BLAIR H.C., TEITELBAUM S.L., EHLICH L.S., et al. Collagenase production by smooth muscle: correlation of immunoreactive with functional enzyme in the myometrium. *J. Cell. Physiol.*, v.129, p.111-23, 1986.
- BOELAERT, K; FRANKLYN, J. A. Thyroid hormone in health and disease. *J. Endocrinol.* v.187, p.1-15, 2005.
- BOWEN, J.A.; BURGHARDT, R.C. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Cell Develop.Biol.*, v.11, p.93-104, 2000.
- BRANDES D, ANTON E. An electron microscopic cytochemical study of macrophages during uterine involution. *J. Cell. Biol.*, v. 41, p. 450-461, 1969.
- BURKIT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. *Wheater Histologia Funcional. Sistema Reprodutor Feminino.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 19, p. 335-365.
- CARNEIRO, R.A., SERAKIDES, R., SOUSA, C.M. et al. Perfil hematológico de ratas castradas e intactas induzidas experimentalmente ao hipertireoidismo. *Arq.*

- Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.220-221, 2000.
- CIDLOWSKI, J. A.; MULDOON, T. G. Modulation by thyroid hormones of cytoplasmic estrogen receptor concentrations in reproductive tissues of the rat. *Endocrinol.*, v.97, p.1621-1629, 1975.
- 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.
- CROSS, J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Cell Develop. Biol.*, v.11, p.105-113, 2000.
- DAI, D.; MOULTON, B.C.; OGLE, T.F. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biol. Reprod.*, v.63, p.188-195, 2000.
- DAI, D.; OGLE, T.F. Progesterone regulation of epidermal growth factor receptor in rat decidua basalis during pregnancy. *Biol. Reprod.*, v.61, p.326-332, 1999.
- DEY, S.K.; LIM, H.; DAS, S.K. et al. Molecular cues to implantation. *Endocrine Rev.*, v.25, p.341-373, 2004.
- DICKSON, W. N. *Glândulas endócrinas*. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. *Fisiologia dos animais domésticos*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p. 571-602, 1993.
- ENDERS, A. C. Anatomical aspects of implantation. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 25, p.1-15, 1976.
- EVANS, K. W., FARWELL, A. P., BRAVERMAN, L. E. Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinol.*, v.113, p.1459-1463, 1983.
- FRANKLIN, J. Endocrinology – Thyrotoxicosis. *Clin. Med.*, v. 3, p. 11-15, 2003.
- FREEMAN, M. E. *The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat*. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The Physiology of reproduction*. 2 ed., New York: Raven Press Ltd, 1994. Cap. 46, p. 613-658.
- GARDNER, R. M.; KIRKLAND, J. L.; IRELAND, J. S.; STANCEL, G. M. Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. *Endocrinol.*, v.103, p.1164-1172, 1978.
- GEYER H, DE GREGORIO G, LERNBECHER G. Oestrogen and progesterone receptors in the involuting rat uterus. *Acta Endocrinol*, v.100, p. 450-454 , 1982.
- GHORBEL, M.; SEUGNET, I.; ABLEITNER, A. M. et al. T3 treatment increases mitosis, then bax expression and apoptosis in the optic lobe of the chick embryo. *Neurosci Lett.*, v.231, p.127-130, 1997.
- 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, 1993. cap.20, p.387-412.
- GU, Y.; JOW, G.M.; MOULTON, B.C. et al. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrine Soc.*, v.135, p. 1272-1279, 2005.
- HAFEZ, E. S. E. *Anatomy of female reproduction*. In: *Reproduction in farm animals*. 6. ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 2, p. 20-55.

- HALME J, WOESSNER JF JR. Effect of progesterone on collagen breakdown and tissue collagenolytic activity in the involuting rat uterus. *J Endocrinol.*, v.66, p.357-62, 1975.
- IMAKAWA, K.; CHANG, K.; CHRISTENSON, R.K. Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *J. Reprod. Dev.*, v.50, p.155-169, 2004.
- INUWA, I.; WILLIAMS, M. A. Morphometric study on the uterine horn and thyroid gland in hypothyroid, and thyroxine treated hypothyroid rats. *J. Anat.*, v.188, p.383-393, 1996.
- JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. *Anatomy of female reproduction*. In: HAFEZ, E. S. E. *Reproduction in farm animals*. 6. ed, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.9, p.213-236.
- JOSWIG, A.; GABRIEL, H.; KIBSCHULL, M. et al. Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.1, p.44-53, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Aparelho reprodutor feminino*. In: _____ *Histologia basica*. 8. ed. Rio de Janeiro: c1995. Cap. 22, p.367-388.
- KAUFMANN, P.; BURTON. *Anatomy and genesis of the placenta*. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. *The Physiol. Reprod.* 2. Ed., New York: Raven Press, Ltd., 1994. Cap.8, p.441-478.
- KIMBER, S.J. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction*, v.130, p.131-145, 2005.
- KIRKLAND, J. L.; GARDNER, R. M.; MUKKU, V. R. et al. Hormonal control of uterine growth: the effect of hypothyroidism on estrogen-stimulated cell division. *Endocrinol.*, v.108, p.2346-2350, 1981.
- KLEINFELD, R.G.; O'SHEA, J.D. Spatial and temporal patterns of deoxyribonucleic acid synthesis and mitosis in the endometrial stroma during decidualization in the pseudopregnant rat. *Biol. Reprod.*, v.28, p.691-702, 1983.
- KOKAWA, K.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*, v.19, p.21-26, 1998.
- LEITE, E. D. *Proliferação, apoptose e histomorfometria da glândula mamária de ratas tratadas com tiroxina durante a gestação, lactação e após o desmame e desenvolvimento pós-natal dos filhotes*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 2006. 80p. (Dissertação, Mestrado em Clínica e Cirurgia)
- MAXIMOW, A.A.; BLOOM, W. *Female genital system*. In: _____ *A textbook of histology*. 7. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1957. Cap. 30, p. 505-544.
- MIRANDA, B. A.; MAGALHÃES, D. L.; SERAKIDES, R. et al. Morfologia da tireóide de ratas na gestação e lactação. *Resumo da X Semana de Iniciação Científica da UFMG*, p.5, 2001.
- MORTON A. J., GOLDSPINK D. F. Changes in protein turnover in rat uterus during pregnancy. *Am. J. Physiol.*, v.250, p. E114-20, 1986.
- MUKKU, V. R.; KIRKLAND, J. L. HARDY, M. et al. Evidence for thyroid hormone receptors in uterine nuclei. *Metabolism*. v. 32, p. 142-145, 1983.

- MULLER H., LIU B., CROY B. A. et al. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein A. *Endocrinol.*, v. 140, p. 2711-2720, 1999.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. *Patologias do útero*. In: _____ Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. 2 Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 5, p. 49-69.
- NOBRE, E. L.; JORGE, Z.; ANSELMO, J. et al. Ma absorção das hormonas tireoideas. *Acta Med. Port.*, v.17, p.487-491, 2004.
- OCARINO, N.M., SERAKIDES, R.; NUNES, V.A. A fase estrogênica altera a resposta do osso e do metabolismo mineral de ratas com hipertireoidismo? *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.503-506, 2003.
- OGLE, T.F.; DAI, D.; GEORGE, P. et al. Regulation of the progesterone receptor and estrogen receptor in decidua basalis by progesterone and estradiol during pregnancy. *Biol. Reprod.*, v.58, p.1188-1198, 1998b.
- OGLE, T.F.; DAI, D.; GEORGE, P. Progesterone-regulated determinants of stromal cell survival and death in uterine decidua are linked to protein kinase C activity. *Steroids*, v.64, p.628-633, 1997.
- OGLE, T.F.; GEORGE, P.; DAI, D. Progesterone and estrogen regulation of rat decidua cell expression of proliferating cell nuclear antigen. *Biol. Reprod.*, v.59, p.444-450, 1998a.
- OGLE, T.F.; MILLS, T.M.; SOARES, M.J. Changes in cytosolic and nuclear progesterone receptors during pregnancy in rat placenta. *Biol. Reprod.*, v. 40, p.1012-1019, 1989.
- OJEDA, S. R.; URBANSKI, H. F. *Puberty in the rat*. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. The *Physiol. Reprod.* 2. Ed., New York: Raven Press, Ltd., 1994. Cap.40, p.363-397.
- OLIVEIRA, T.S., NUNES, V.A., NASCIMENTO, E.F. et al. Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.448-456, 2005.
- OREN, R.; DABEVA, M. D.; KARNEZIS, A. N. et al. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology*, v.30, p.903-913, 1999.
- PARR, E.L.; TUNG, H.N.; PARR, M.B. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol. Reprod.*, v.36, p.211-225, 1987.
- PELLETIER, G.; LABRIE, C.; LABRIE, F. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.*, v.165, p.359-370, 2000.
- PIVA M, FLIEGER O, RIDER V. Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent. *Biol. Reprod.*, v. 55, p. 1333-1342, 1996.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B. et al. *Afip laboratory methods in histotechnology*. Washington: AM Registry of Pathology, 1992, 278p.
- RAHMAN, A.N.; SNIBSON, K.J.; LEE, C.S. et al. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium. *J. Reprod. Imm.*, v.64, p.45-58, 2004.
- RASMUSSEN, C.A.; ORWIG, K.E.; VELLUCCI, S. et al. Dual expression of

- prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. *Biol.Reprod.*, v.56, p.647-654, 1997.
- ROBEL, P. *Steroid hormone receptors involved in reproduction: mechanism of action*. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. *Reproduction in mammals and man*. Paris, 1993. Cap. 8, p. 143-165.
- ROSATO, R. R.; GIMENEZ, M. S.; JAHN, G. A. Effects of chronic thyroid hormone administration on pregnancy, lactogenesis and lactation in the rat. *Acta Endocrinol.*, v.127, p.547-54, 1992.
- RUH, T. S.; BAUDENDISTEL, L. J. Different nuclear binding sites for antiestrogen and estrogen receptor complexes. *Endocrinol.*, v.100, p.420-422, 1977.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998. 211p.
- SCHLAFKE, S.; ENDERS, A. C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.*, v. 12, p. 41-65, 1975.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E. F. et al. Foliculogênese e esteroidogênese ovarianas em ratas adultas hipertireóideas. *Arq. Bras. End. Metab.*, v.45, p.258-264, 2001.
- SERAKIDES, R., NUNES, V.A., NASCIMENTO, E.F. et al. Hipogonadismo e função tireoidiana em ratas hipertireóideas e eutireóideas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, p.571-578, 2000a.
- SERAKIDES, R., NUNES, V.A., NASCIMENTO, E.F. et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.579-585, 2000b.
- SERAKIDES, R.; OCARINO, N.M.; CARDOSO, T.G..S. et al. Resposta da paratireóide de ratas às variações do cálcio e fósforo plasmáticos no hipertireoidismo e hipogonadismo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.57, p. 48-54, 2005.
- SERAKIDES, R. *Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 2001. 90p. (Tese, Doutor em Ciência Animal).
- SHI, Y. B.; SACHS, L. M.; JONES, P. et al. Thyroid hormone regulation of *Xenopus laevis* metamorphosis: functions of thyroid hormone receptors and roles of extracellular matrix remodeling. *Wound Repair Regen.*, v.6, p.314-322, 1998.
- SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G. et al. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *Am. Soc. Clin. Invest.*, v. 91, p. 2235-2243, 1993.
- SILVA, C.M., SERAKIDES, R., OLIVEIRA, T.S. et al. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.628-639, 2004.
- SMITH, S.K. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Endocrinol. Metab.*, v.12, p.147, 2001.
- SOARES, M.J.; MILLER, H.; ORWIG, K.E. et al. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol. Reprod.*, v.58, p.273-284, 1998.
- 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.

TAKAMOTO N., LEPPERT P.C., YU SY. Cell death and proliferation and its relation to collagen degradation in uterine involution of rat. *Connect Tissue Res.*, v.37, p.163-75, 1998.

TSENG, L.; ZHU, H. H. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid by progestin in human endometrial stromal cells. *Biol. Reprod.*, v. 57, p.1360-1366, 1997.

TRIVALLE C., DOUCET J., CHASSAGNE P. et al. Differences in the signs and symptoms of hyperthyroidism in older and younger patients. *J.Am. Geriatr. Soc.*, v.44, p.50-53, 1996.

VARAS S.M.; MUNOZ E. M.; HAPON M. B. et al. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats. *Reprod.*, v.124, p.691-702, 2002.

VOGIAGIS, D.; SALAMONSEN, L.A. The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J. Endocrinol.*, v.160, p.181-190, 1999.

WANG, H.; ERIKSSON, H; SAHLIN, L. Estrogen receptor α and β in the female reproductive tract of the during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1331-1340, 2000.

WEITLAUF, H. M. *Biology of implantation*. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. *The Physiol. Reprod.* 2. Ed., New York: Raven Press, Ltd., 1994. Cap.7, p.391-440.

WELGUS, H.G., GRANT, G.A., SACCHETTINI, J.C et al. The gelatinolytic activity of rat uterus collagenase. *J. Biol. Chem.*, v.260, p.13601-6, 1985

WHITELAW, P.F., CROY, B. A. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta*, v.17, p.533-543, 1996.

WOESSNER JR., J. F. Total, latent and active collagenase during the course of postpartum involution of the rat uterus. Effect of oestradiol. *Biochem. J.*, v. 180, p. 95-102, 1979.

WOLF K., SANDNER P., KURTZ A., MOLL W. Messenger ribonucleic acid levels of collagenase (MMP-13) and matrilysin (MMP-7) in virgin, pregnant, and postpartum uterus and cervix of rat. *Endocrinol.*, v. 137, p. 5429-5434, 1996.

8. ANEXOS

Experimento 1

Anexo 8.1. Análise de variância da altura do epitélio folicular das tireóides de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 7, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	368,64	-	-	-
Tratamentos	5	352,33	70,465	116,62	0,0001
Erro	27	16,315	0,6042	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 6,83%

Anexo 8.2. Análise de variância do consumo diário de água de ratas normais e gestantes eutireóideas e hipertireóideas.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	2855	-	-	-
Tratamentos	3	1970,8	656,92	13,372	0,0001
Erro	18	884,28	49,13	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 11,05%

Anexo 8.3. Análise de variância do consumo diário de ração de ratas normais e gestantes eutireóideas e hipertireóideas.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	262	-	-	-
Tratamentos	3	127,9	42,634	5,722	0,0062
Erro	18	134,1	7,45	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 9,59%

Anexo 8.4. Análise de variância do peso das ratas eutireóideas e hipertireóideas sem o útero aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	21165	-	-	-
Tratamentos	5	5594,4	1118,9	1,940	0,1204
Erro	27	15571	576,69	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 8,04 %

Anexo 8.5. Análise de variância do peso médio dos ovários (g) das ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	0,005858	-	-	-
Tratamentos	5	0,003904	0,0007809	10,791	0,0001
Erro	27	0,001954	7,237E-05	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 17,46 %

Anexo 8.6. Análise de variância do peso individual dos fetos (g) de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	24700	-	-	-
Tratamentos	3	24519	8,173	766,85	0,0001
Erro	17	0,1812	0,01066	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 16,94 %

Anexo 8.7. Análise de variância do peso uterino com os fetos (g) de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	14851	-	-	-
Tratamentos	5	13480	2696	53,082	0,0001
Erro	27	1371,3	50,790	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 21,63%

Anexo 8.8. Análise de variância do peso uterino sem os fetos (g) de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	1041,5	-	-	-
Tratamentos	3	807,21	269,07	19,527	0,0001
Erro	17	234,25	13,779	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 24,86%

Anexo 8.9. Análise de variância da espessura do endométrio de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	6321806	-	-	-
Tratamentos	3	6215222	2071741	349,88	0,0001
Erro	18	106584	5921,3	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 19,18%

Anexo 8.10. Análise de variância da espessura do miométrio de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	404198	-	-	-
Tratamentos	3	214789	71596	6,804	0,0029
Erro	18	189409	10523	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 24,97%

Anexo 8.11. Análise de variância da espessura do perimétrio de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	293987	-	-	-
Tratamentos	3	17117	5705,5	0,3709	0,7749
Erro	18	276870	15382	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 26%

Anexo 8.12. Análise de variância do número de células do endométrio/campo com expressão de CDC-47 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	21	574963	-	-	-
Tratamentos	3	548456	182819	124,14	0,0001
Erro	18	26507	1472,6	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 33,22 %

Anexo 8.13. Análise de variância do número de células do miométrio/campo com expressão de CDC-47 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	5583,5	-	-	-
Tratamentos	5	4736,8	947,36	30,210	0,0001
Erro	27	846,70	31,36	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 39,50%

Anexo 8.14. Análise de variância do número de células do perimétrio/campo com expressão de CDC-47 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	16120	-	-	-
Tratamentos	5	13141	2628,3	23,823	0,0001
Erro	27	2978,8	110,32	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 41,75%

Anexo 8.15. Análise de variância do número de células do endométrio/campo com expressão de Caspase-3 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	8926,5	-	-	-
Tratamentos	5	4524,6	904,92	5,550	0,0012
Erro	27	4402,0	163,04	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 24,45 %

Anexo 8.16. Análise de variância do número de células do miométrio/campo com expressão de Caspase-3 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	3997,0	-	-	-
Tratamentos	5	3720,2	744,05	72,594	0,0001
Erro	27	276,73	10,249	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 31,4%

Anexo 8.17. Análise de variância do número de células do perimétrio/campo com expressão de Caspase-3 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos sete, 14 e 19 dias de gestação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	32	636,24	-	-	-
Tratamentos	5	387,54	77,508	8,415	0,0001
Erro	27	248,70	9,211	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 25,53 %

Anexo 8.18. Análise de variância do diâmetro médio do disco placentário de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	8766399	-	-	-
Tratamentos	3	4958878	1652959	7,380	0,0022
Erro	17	3807521	223972	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 8,65 %

Anexo 8.19. Análise de variância da espessura do labirinto placentário de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	10,229	-	-	-
Tratamentos	3	8,591	2,864	29,724	0,0001
Erro	17	1,64	0,096	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 15,91 %

Anexo 8.20. Análise de variância do número de células do labirinto placentário/campo com expressão de CDC-47 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	62885	-	-	-
Tratamentos	3	33673	11224	6,532	0,0039
Erro	17	29211	1718,3	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 13,68 %

Anexo 8.21. Análise de variância do número de células do labirinto placentário/campo com expressão de Caspase-3 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	399,24	-	-	-
Tratamentos	3	355,50	118,50	46,064	0,0001
Erro	17	43,733	2,573	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 21%

Anexo 8.22. Análise de variância da espessura da camada de espongiotrofoblasto de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	1,187	-	-	-
Tratamentos	3	0,8440	0,2813	13,937	0,0001
Erro	17	0,3432	0,02019	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 19,51%

Anexo 8.23. Análise de variância do número de células do espongiotrofoblasto/campo com expressão de CDC-47 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	58849	-	-	-
Tratamentos	3	53461	17820	56,234	0,0001
Erro	17	5387,2	316,90	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 10,31%

Anexo 8.24. Análise de variância do número de células do espongiotrofoblasto/campo com expressão de Caspase-3 de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	10,952	-	-	-
Tratamentos	3	0,5190	0,1730	0,2819	0,8377
Erro	17	10,433	0,6137	-	-

Coefficiente de variação (CV) = 75,12%

Anexo 8.25. Análise de variância da espessura da camada de células gigantes trofoblásticas de ratas eutireóideas e hipertireóideas aos 14 e 19 dias de gestação

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	Significância
Total	20	0,05640	-	-	-
Tratamentos	3	0,03225	0,01075	7,567	0,0020
Erro	17	0,02415	0,001421	-	-

Coeficiente de variação (CV) = 29,25%