

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

BIANCA REIS SANTOS

**PAPEL DA KISSPEPTINA E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DISFUNÇÃO
FETO-PLACENTÁRIA DE RATAS HIPOTIREOIDEAS: AVALIAÇÃO DE FATORES
DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO E MEDIADORES DE ESTRESSE CELULAR
E DO INFLAMASSOMA**

**ILHÉUS - BAHIA
2021**

BIANCA REIS SANTOS

**PAPEL DA KISSPEPTINA E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DISFUNÇÃO
FETO-PLACENTÁRIA DE RATAS HIPOTIREOIDEAS: AVALIAÇÃO DE FATORES
DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO E MEDIADORES DE ESTRESSE CELULAR
E DO INFLAMASSOMA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

ILHÉUS - BAHIA

2021

S237

Santos, Bianca Reis.

Papel da Kisspeptina e seu potencial terapêutico na disfunção feto-placentária de ratas hipotireoideas : avaliação de fatores de crescimento placentário e mediadores de estresse celular e do inflamassoma / Bianca Reis Santos. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.
101f.: il.

Orientador: Juneo Freitas Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências e apêndices.

1. Neuropeptídeos. 2. Expressão gênica. 3. Trofoblasto. 4. Tireoide. 5. Estresse. 6. Inflamação. 7. Feto – Desenvolvimento. I. Título.

CDD 615.1

BIANCA REIS SANTOS

**PAPEL DA KISSPEPTINA E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DISFUNÇÃO
FETO-PLACENTÁRIA DE RATAS HIPOTIREOIDEAS: AVALIAÇÃO DE FATORES
DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO E MEDIADORES DE ESTRESSE CELULAR
E DO INFLAMASSOMA**

Ilhéus – BA, 04/03/2021

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB
(Orientador)

Dr^a. Fabiana Lessa Silva
UESC/DCAA

Dr^a. Rogéria Serakides
UFMG/DCCV

**ILHÉUS - BAHIA
2021**

Dedico a Florisvaldo Alves do Santos (*in memoriam*), eterno Vovô Flori, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem me concedido, por me dar forças e saúde em um ano tão difícil como o passado, e ainda sim me permitir fazer dele o mais produtivo da minha vida. Agradeço a Ele, por colocar pessoas maravilhosas na minha vida que me acompanham e me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais, Jocimara Reis Santos (mainha) e Erisvaldo Alves do Santos (painho), por me darem todo amor, carinho e apoio diário que me ajuda a seguir todos os dias. Agradeço a eles por lutarem comigo nas minhas batalhas e por me apoiarem nos meus sonhos, sem nunca questionar ou mesmo duvidar das minhas capacidades. Amo muito vocês.

Aos meus avôs, Emília (Vovó Emília), Maria José (Vovó Zezé) e Florisvaldo (Vovô Flori, *in memoriam*) por todo amor e carinho, que em todas as minhas conquistas tive o prazer de contar a eles e receber um genuíno sorriso, e por ficarem felizes ao me ver feliz.

A todos os meus tios e primos, pelo amor e carinho.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos, em particular, Victor, João e Bia, por estarem ao meu lado, desde a escola, me apoiando e fazendo desse árduo caminho um pouco mais leve.

Ao meu orientador, Professor Juneo, por abrir as portas para mim, permitindo que eu realizasse o meu sonho de ser pesquisadora, pelas orientações, ajuda e apoio na vida acadêmica. Agradeço por sempre querer o melhor de nós, e acreditar que somos capazes de entregar o melhor. Obrigada por tudo, professor.

A todos do grupo NuRE, Adriana, Emilly, Isabela, Larissa, Letícia, Luciana, Brenda, Natália e Maria Clara, e principalmente a Erikles e Thayná por estarem comigo nessa caminhada desde o começo, e a Jeane e Luciano, pelas ajudas, conselhos e imunos (só quem viveu sabe).

Aos colegas, Maíra e Amanda (estudante de direito e auxiliar de biotério nas horas vagas) pelos momentos de descontração após experimentos no biotério. Vamos marcar essa pizza... rs. A Gisele, pelo companheirismo e momentos de descontração.

A Dona Jaci por todo carinho e acolhimento diário no dia a dia no CME.

A Ivo, Seu Zé, Jamille, Lane e a todos os funcionários da UESC, pela paciência e ajuda diária.

A todos os professores que tive a oportunidade de conhecer, por todos os conselhos e ensinamentos.

A Universidade Estadual de Santa Cruz e Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelo suporte e infraestrutura.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que sempre me ajudaram direta e indiretamente.

A todos esses serei eternamente grata.

PAPEL DA KISSPEPTINA E SEU POTENCIAL TERAPÊUTICO NA DISFUNÇÃO FETO-PLACENTÁRIA DE RATAS HIPOTIREOIDEAS: AVALIAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO E MEDIADORES DE ESTRESSE CELULAR E DO INFLAMASSOMA

RESUMO

Alterações no nível plasmático e/ou placentário de kisspeptina (Kiss1) estão associadas com doenças gestacionais. No entanto, embora estudos tenham sugerido que kisspeptina apresenta efeito antioxidante e imunomodulatório na interface materno-fetal e outros tenham demonstrado que o hipotireoidismo causa disfunção gestacional e estresse placentário, ainda não há informações sobre o papel da kisspeptina na disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da kisspeptina e seu potencial terapêutico na disfunção feto-placentária de ratas hipotireoideas. Foram utilizadas Ratas Wistar adultas e o hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil (PTU) (4mg/Kg/dia). No **Experimento 1**, os animais foram divididos nos grupos controle (N=18) e hipotireoideo (N=20) e foram avaliados o desenvolvimento feto-placentário e a expressão gênica e proteica de Kiss1 e seu receptor (Kiss1R) na decídua e placenta aos 14 e 18 dias de gestação (DG). O hipotireoidismo reduziu o peso fetal e uteroplacentário, além de reduzir a expressão de mRNA de *Kiss1* na decídua e placenta aos 14 e 18 DG, respectivamente. Para Kiss1R, o hipotireoidismo não somente reduziu a imunomarcagem no triângulo Metrial e camada de células gigantes aos 14 DG, como reduziu a expressão gênica na decídua e placenta no mesmo período gestacional. Considerando que houve redução do sistema Kiss1/Kiss1R na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas, no **Experimento 2** foi avaliado o potencial terapêutico de Kisspeptina-10 (Kp10) na disfunção feto-placentária desses animais. Os animais foram divididos nos grupos controle (N=8), hipotireoideo (N=8) e hipotireoideo tratado com Kp10 (8µg/Kg/dia) dia sim/dia não (KpT1) (N=8) ou diariamente (KpT2) (N=8). O tratamento iniciou no 8º DG e no 18º DG foram avaliados o desenvolvimento feto-placentário, a histomorfometria placentária e a expressão gênica e/ou proteica de fatores de crescimento (VEGF, PLGF, IGF1, IGF2 e GLUT1), mediadores inflamatórios (TNFα, IL10 e IL6), mediadores de estresse oxidativo (HIFα, SOD1, Cat, GPx1), mediadores de estresse de retículo endoplasmático (ATF4, GRP78 e CHOP) e mediadores do inflamassoma (NLRP3, IL1β, IL18) e piroptose (Caspase1, Gasdermina D). O tratamento diário com Kp10 aumentou o peso fetal e reverteu o crescimento fetal assimétrico causado pelo hipotireoidismo materno. Ambos os tratamentos reestabeleceram parcialmente a morfologia da zona juncional e aumentaram a vascularização no labirinto placentário. O tratamento diário com Kp10 aumentou a expressão gênica de fatores de crescimento (*Plgf*, *Igf1*) e de transporte (*Glut1*) na placenta dos animais hipotireoideos, além de aumentar a expressão proteica e de mRNA de enzimas antioxidantes (SOD1, Cat, GPx1). Embora o tratamento diário com Kp10 não tenha alterado a maior expressão gênica e/ou proteica de VEGF, HIF1α, IL10, GRP78 e CHOP causada pelo hipotireoidismo, especialmente na zona juncional, reduziu a imunomarcagem desses mediadores na zona do labirinto quando comparado ao grupo hipotireoideo. Além disso, o tratamento com Kp10 bloqueou o aumento da expressão gênica placentária

de mediadores do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il18*) causado pelo hipotireoidismo materno. No entanto, o tratamento com Kp10 aumentou a imunomarcagem placentária de TNF α e a expressão gênica de *Il1 β* e *Caspase1* em relação aos grupos controle e hipotireoideo, enquanto não foi observada diferenças na expressão placentária de *Gasdermina D* entre os grupos experimentais. Conclui-se que a restrição de crescimento feto-placentária observada em ratas com hipotireoidismo materno está associada com uma redução do sistema kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal. Além disso, o tratamento diário com Kp10 em ratas gestantes hipotireoideas não somente melhora o desenvolvimento feto-placentário e a vascularização placentária, como aumenta a expressão de fatores de crescimento e enzimas antioxidantes e bloqueia a ativação do inflamassoma causado pelo hipotireoidismo.

PALAVRAS-CHAVE: kisspeptina, trofoblasto, tireoide, estresse, inflamação, desenvolvimento fetal.

ROLE OF KISSPEPTIN AND ITS THERAPEUTIC POTENTIAL IN THE FETAL-PLACENTAL DYSFUNCTION OF HYPOTHYROID RATS: EVALUATION OF PLACENTAL GROWTH FACTOR AND CELLULAR STRESS AND INFLAMMASOME MEDIATORS

ABSTRACT

Changes in the plasma and / or placental level of kisspeptin (Kp) are associated with pregnancy disorders. However, although studies have suggested that Kp has an antioxidant and immunomodulatory effect at the maternal-fetal interface and others have shown that hypothyroidism causes gestational dysfunction and placental stress, there is still no information on the role of kisspeptin in placental dysfunction caused by maternal hypothyroidism. Therefore, the objective of this work was to evaluate the role of kisspeptin and its therapeutic potential in the fetal-placental dysfunction of hypothyroid rats. Adult Wistar rats were used and hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil (PTU) (4mg/Kg/day). In Experiment 1, the animals were divided into the control (N=18) and hypothyroid (N=20) groups and the fetal-placental development and the gene and protein expression of Kiss1 and its receptor (Kiss1R) in the decidua and placenta were evaluated at 14 and 18 days of gestation (DG). Hypothyroidism reduced fetal and uteroplacental weight, in addition to reducing Kiss1 mRNA expression in the decidua and placenta at 14 and 18 DG, respectively. For Kiss1R, hypothyroidism not only reduced immunostaining in the Metrial triangle and giant cell layer at 14 DG, but also reduced gene expression in the decidua and placenta in the same gestational period. Considering that there was a reduction in the Kiss1/Kiss1R system in the maternal-fetal interface of the hypothyroid rats, in Experiment 2 the therapeutic potential of Kisspeptin-10 (Kp10) in the fetal-placental dysfunction of these animals was evaluated. The animals were divided into the control (N=8), hypothyroid (N=8) and hypothyroid groups treated with Kp10 (8µg/Kg/day) every other day (KpT1) (N=8) or daily (KpT2) (N=8). The treatment started in the 8th DG and the fetal-placental development, the placental histomorphometry and the gene and/or protein expression of growth factors (VEGF, PLGF, IGF1, IGF2 and GLUT1), inflammatory mediators (TNF α , IL10 and IL6), oxidative stress mediators (HIF α , SOD1, Cat, GPx1), endoplasmic reticulum stress mediators (ATF4, GRP78 and CHOP) and inflammasome (NLRP3, IL-1 β , IL-18) and pyroptosis (Caspase1, Gasdermin D) mediators were evaluated at 18 GD. Daily treatment with Kp10 increased fetal weight and reversed asymmetric fetal growth caused by maternal hypothyroidism. Both treatments partially reestablished the morphology of the junctional zone and increased vascularization in the placental labyrinth. Daily treatment with Kp10 increased the gene expression of growth factors (*Plgf*, *Igf1*) and transport (*Glut1*) in the placenta of hypothyroid animals, in addition to increasing protein and mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD1, Cat, GPx1). Although daily treatment with Kp10 did not alter the greater VEGF, HIF1 α , IL10, GRP78 and CHOP expression caused by hypothyroidism, especially in the junctional zone, it reduced the immunostaining of these mediators in the labyrinth zone when compared to the hypothyroid group. In addition, treatment with Kp10 blocked the increase in placental gene expression of inflammasome mediators (*Nlrp3*, *Il18*) caused by maternal hypothyroidism. However, treatment with Kp10 increased the placental immunostaining of TNF α and the gene expression of *Il1 β* and *Caspase1* in relation to the control and hypothyroid groups, while no differences were observed in the placental expression of *Gasdermin D* between the experimental groups. It is concluded that the fetal-placental growth

restriction observed in rats with maternal hypothyroidism is associated with a reduction in the kisspeptin/Kiss1R system at the maternal-fetal interface. In addition, daily treatment with Kp10 in hypothyroid pregnant rats not only improves fetal placental development and placental vascularization but increases the expression of growth factors and antioxidant enzymes and blocks the activation of the inflammasome caused by hypothyroidism.

Key words: kisspeptin, trophoblast, thyroid, stress, inflammation, fetal development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confirmação do hipotireoidismo e avaliação do peso fetal e placentário das ratas controles e hipotireoideas. A) Níveis de T3 e T4 livres (ng/dL) no dia 0 DG (média±SEM; n = 5-6). B) Peso uteroplacentário nos dias 14 e 18 DG (média±SEM; n = 5-6). C) Peso fetal nos dias 14 e 18 DG (Mediana, mínimo a máximo; N = 34-73). D-E) Curvas de distribuição da frequência relativa do peso fetal nos dias 14 (D) e 18 DG (E). Diferenças significativas foram determinadas por teste t Student não pareado, exceto peso fetal que foram determinadas por teste de Mann-Whitney, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001.....49

Figura 2. Expressão gênica e proteica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na interface materno-fetal das ratas controles e hipotireoideas. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Kiss1 no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de Kiss1 no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (média±SEM; n = 6). C-D) Expressão gênica relativa de *Kiss1* na decídua (C) e placenta (D) aos 14 e 18 DG (média±SEM; n = 6-7). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Kiss1R no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). F) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de Kiss1R no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (média±SEM; n = 6). G-H) Expressão gênica relativa de *Kiss1r* na decídua (G) e placenta (H) aos 14 e 18 DG (média±SEM; n = 6-7). Diferenças significativas foram determinadas por teste t Student não pareado, *p < 0.05.....51

Figura 3. Parâmetros maternos e fetais das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT1 e KpT2) no 18º DG. A) Imagem representativa de fetos e placentas de cada grupo experimental. B) Ganho de peso materno durante a gestação (média±SEM; n = 8). C-D) Peso uteroplacentário (C) e do líquido amniótico (D) (média±SEM; n = 8). E) Número de fetos viáveis/ninhada (média±SEM; n = 8). F) Porcentagem de morte fetal (mediana, mínimo a máximo; n = 8). G) Curva de distribuição da frequência relativa do peso fetal. H) Peso fetal (mediana, mínimo a máximo; n = 63 -76). I) Peso dos órgãos fetais (fígado, cérebro, coração, pulmão, rim) (média±SEM; n = 15-30). J) Relação cérebro/fígado (média±SEM; n = 15-30). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, exceto para peso fetal e morte fetal que foram determinadas por teste de Kruskal-Wallis post hoc Dunn's, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. KpT1= tratamento dia sim/não com Kp10; KpT2= tratamento diário com Kp10.....54

Figura 4. Avaliação histomorfométrica da placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT1 e KpT2) no 18º DG. A-D) Fotomicrografias ilustrativas da interface materno-fetal (A) e das camadas da placenta (B, células gigantes; C, espongiotrofoblasto; D, labirinto placentário) (Coloração de Hematoxilina e eosina; Bar= 500µm (A); 50µm (B-D)). E) Espessura da zona juncional (células gigantes+espongiotrofoblasto) e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). F)

Porcentagem de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes no espongiotrofoblasto (média±SEM; n = 8). G-H) Porcentagem de área ocupada por seio vascular materno, capilares fetais e mesênquima fetal/trofoblasto nas regiões superior (G) e inferior (H) do labirinto placentário (média±SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01. TM = Triângulo Metrial; DB= Decídua Basal; ZJ= Zona Juncional; LP= Labirinto Placentário; VC= Vaso central; EP= espongiotrofoblasto; SUP= Região Superior do Labirinto Placentário; INF= Região Inferior do Labirinto Placentário; Seta= células de glicogênio; Cabeça de seta= Capilares fetais; asteriscos = Seio vascular materno; KpT1= tratamento dia sim/não com Kp-10; KpT2= tratamento diário com Kp-10.....56

Figura 5. Expressão gênica e/ou proteica de fatores de crescimento (VEGF, PlGF, IGF1, IGF2) e transportador (GLUT1) na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18º DG. A-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de VEGF na zona juncional (A-C) e labirinto placentário (D-F) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). G) Área de imunomarcção em pixels da expressão de VEGF na zona juncional e labirinto placentário aos 14 DG (média±SEM; n = 8). H) Expressão gênica relativa de *Vegf*, *Pigf*, *Igf1*, *Igf2* e *Glut1* na placenta (média±SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. KpT2= tratamento diário com Kp10.....58

Figura 6. Expressão gênica e/ou proteica de mediadores imunológicos (TNFα, IL-10 e IL-6) na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18º DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de TNFα na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de TNFα na zona juncional e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de IL-10 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de IL-10 na zona juncional e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). E) Expressão gênica relativa de *Tnf*, *Il10* e *Il6* na placenta (média±SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. KpT2= tratamento diário com Kp10.....60

Figura 7. Expressão gênica e/ou proteica de enzimas antioxidantes (SOD1, catalase e GPx1/2) e HIF1α na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18º DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de SOD1 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1 na zona juncional e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de catalase na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de catalase na zona juncional e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de GPx1/2 na zona juncional e

labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de GPx1/2 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). G) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). H) Área de imunomarcção em pixels da expressão de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). I) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *catalase*, *Gpx1* e *Hif1 α* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. KpT2= tratamento diário com Kp10.....62

Figura 9. Expressão gênica e/ou proteica de mediadores do estresse de retículo endoplasmático (GRP78, CHOP e ATF4) na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18^o DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de GRP78 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de GRP78 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de CHOP na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de CHOP na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ATF4 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ATF4 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). G) Expressão gênica relativa de *Grp78* e *Chop* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001. KpT2= tratamento diário com Kp10.....65

Figura 8. Expressão gênica de mediadores do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*) e piroptose (*Casp1* e *Gsdmd*) na placenta das ratas controle, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18^o DG. Expressão gênica relativa de *Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*, *Casp1* e *Gsdmd* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. KpT2= tratamento diário com Kp10.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempos de incubação e revelação.....45

Tabela 2 Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.....47

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise De Variância

ASC – Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A Caspase-Recruitment Domain

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

CSF-1 – Fator Estimulador de Colônias 1

DAB – diaminobenzidina

DAMP – Damage-Associated Molecular Pattern

DIC - Delineamento Inteiramente Casualizado

DNase – desoxirribonuclease

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

ERE – Estresse de Retículo Endoplasmático

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – hormônio liberador de gonadotropina

GPR54 – Receptor 54 acoplado a proteína Gq

HIF – Fator Induzível por Hipóxia

Hoxa-10 – Proteína Homeobox Hox-A10

IFN- γ – Interferon γ

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-11 – Interleucina 11

IL-15 – Interleucina 15

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

Kp10 – Kisspeptina 10

LH – Hormônio Luteinizante

LIF – Fator Inibidor de Leucemia
MEC – Matriz Extracelular
MIF – Fator de Inibição de Migração de Macrófagos
MMP-2 – Metaloproteinase de Matriz 2
MMP-9 – Metaloproteinase de Matriz 9
MMP-12 – Metaloproteinase de Matriz 12
MMP-14 – Metaloproteinase de Matriz 14
Nf-κB – Fator Nuclear-κB
NKs – Célula Natural *Killer*
NLRP3 – NLR Family Pyrin Domain Containing 3
p38 map quinase – Proteína Quinase p38 Ativada por Mítógeno
PAI – Inibidor de Plasminogênio Ativado
PAMP – Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS – Solução Fosfato Tamponada
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PL-1 – Lactogênio Placentário 1
PLGF – fator de crescimento placentário
PTU – 6-propyl-2-thiouracil
RE – Retículo Endoplasmático
RNase – Ribonuclease
SGA – Small for Gestational Age
SNK – *Student Newman Keuls*
TGF-β – Fator De Crescimento Transformante β
TIMPs – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
Treg – Linfócitos T regulatórios
TXNIP – Thioredoxin-Interacting Protein
uNKs – Células *Natural Killers* Uterinas
uPA – Ativador de Plasminogênio Uroquinase
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 Interface Materno-Fetal	25
3.1.1 <i>Decidualização em ratas</i>	25
3.1.2 <i>Placentação em ratas</i>	27
3.1.3 <i>Remodelamento vascular</i>	29
3.1.4 <i>Regulação da invasão e migração trofoblástica</i>	30
3.2 Kisspeptina e Gestação	32
3.3 Hipotireoidismo Materno	35
3.4 Nlrp3 Inflamassoma e Piroptose	36
4 CAPÍTULO I	38
4.1 Introdução	38
4.2 Material e Métodos	41
4.2.1 <i>Animais</i>	41
4.2.2 <i>Delineamento experimental</i>	41
4.2.3 <i>Manejo animal e Indução do hipotireoidismo</i>	42
4.2.4 <i>Tratamento com kisspeptina-10 (Kp10)</i>	43
4.2.5 <i>Eutanásia e Coleta de Material</i>	43
4.2.6 <i>Análise hormonal</i>	44
4.2.7 <i>Avaliação do desenvolvimento fetal</i>	44
4.2.8 <i>Análise Histomorfométrica</i>	44
4.2.9 <i>Imuno-histoquímica</i>	45
4.2.10 <i>qRT-PCR</i>	46
4.2.11 <i>Análise estatística</i>	49
4.3 Resultados	50
4.3.1 <i>Hipotireoidismo materno compromete o desenvolvimento feto-placentário</i>	50
4.3.2 <i>Hipotireoidismo materno compromete a expressão placentária e decidual do sistema kisspeptina/Kiss1R em ratas</i>	52
4.3.3 <i>Tratamento diário com kisspeptina-10 melhora o desenvolvimento fetal de ratas hipotireoideas</i>	54
4.3.4 <i>Tratamento diário com kisspeptina-10 melhora o desenvolvimento placentário de ratas hipotireoideas</i>	57
4.3.5 <i>Tratamento com kisspeptina-10 aumenta a expressão gênica placentária de fatores de crescimento (Plgf, Igf1) e de transporte (Glut1) em ratas com hipotireoidismo</i>	59
4.3.6 <i>Tratamento com kisspeptina-10 altera a expressão placentária de IL10 e TNFα em ratas com hipotireoidismo</i>	61
4.3.7 <i>Tratamento com kisspeptina-10 aumenta a expressão placentária de enzimas antioxidantes em ratas hipotireoideas</i>	62
4.3.8 <i>Tratamento com kisspeptina-10 afeta a expressão de mediadores de estresse reticular na placenta de ratas hipotireoideas</i>	65

4.3.9 Tratamento com kisspeptina-10 bloqueia o aumento da expressão gênica placentária de mediadores do inflamassoma em ratas com hipotireoidismo.....	66
4.4 Discussão.....	69
4.5 Conclusão.....	79
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	80
APÊNDICE I.....	93
APÊNDICE II.....	94
APÊNDICE III.....	95
APÊNDICE IV.....	99
APÊNDICE V.....	102

1 INTRODUÇÃO

A kisspeptina, por meio do seu receptor Kiss1R, é o neuropeptídeo chave da reprodução por estimular a secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, conseqüentemente, regular o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018; NAVARRO, 2020). No entanto, além de suas ações hipotalâmicas, o sistema Kisspeptina/Kiss1R é expresso em uma variedade de tecidos, incluindo a placenta (CAO et al., 2019; D'OCCHIO; CAMPANILE; BARUSELLI, 2020). Apesar disso, estudos sobre o seu papel nesse órgão ainda são escassos.

Durante a gestação de humanos, os níveis séricos de kisspeptina sofrem intenso aumento, principalmente no terço final da gestação, que é atribuído a proliferação das células gigantes trofoblásticas que são responsáveis pela síntese de kisspeptina na placenta (HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018; HIDDEN et al., 2007; HU et al., 2019b). Estudos sugerem que a kisspeptina é importante na adesão e implantação do blastocisto, além de auxiliar na decidualização e regular a tolerância imunológica materna e a infiltração das células *natural killers* uterinas (uNKs). Por isso, a kisspeptina tem sido considerada como importante para a progressão da gestação e para o crescimento fetal (CAO et al., 2019; FAYAZI et al., 2015; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014; HIDDEN et al., 2007; HU et al., 2019a, 2019b; PARK et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

A placenta é um órgão de elevada plasticidade e variabilidade funcional. Ela é capaz de modular a fisiologia materna e o desenvolvimento fetal ao permitir a troca de nutrientes e oxigênio entre a mãe e o feto, além da produção de hormônios, citocinas e fatores de crescimento (APLIN et al., 2020; FOWDEN et al., 2008). A placentação hemocorial, presente em humanos e ratas, é caracterizada pelo contato direto do trofoblasto com o sangue materno, além de apresentar extensa invasão trofoblástica que alcança o terço inicial ou médio do miométrio (FOWDEN et al., 2008; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018). Pelas similaridades morfofuncionais com o processo de placentação humana, a rata é considerada um bom modelo animal para o estudo

comparado de placentação e disfunção placentária (HEMBERGER; HANNA; DEAN, 2020; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012).

As células trofoblásticas que formam a placenta possuem a característica de migração e invasão, além de serem capazes de reconhecer, modificar e modular o comportamento de outras células e estruturas presentes na interface materno-fetal (HUPPERTZ, 2020; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2014). As células trofoblásticas na placenta da rata são distribuídas em duas principais camadas, a zona juncional, composta por células gigantes trofoblásticas, células de glicogênio e espongiotrofoblastos, que é responsável pela nutrição e função endócrina da placenta; e a zona de labirinto, formada por seios vasculares maternos, capilares fetais e cordões de trofoblasto sincicial, e responsável pelo transporte de nutrientes. Além disso, a formação da barreira interhemal pelos trofoblastos sinciciais e a imunomodulação que as células trofoblásticas exercem sobre o sistema imune materno garantem a proteção do feto. Outra linhagem que também compõe a placenta e é fundamental no processo de remodelamento vascular uterino são os trofoblastos endovasculares, que invadem os vasos e substituem as células endoteliais, e os trofoblastos intersticiais, que fazem a invasão perivascular ao logo da decídua, ambos com a função de permitir melhor oxigenação e troca de nutrientes na interface materno-fetal (HUPPERTZ, 2020; ROSARIO et al., 2009; SATO, 2020; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018).

Falhas na migração trofoblástica, resultando em invasão superficial e no remodelamento inadequado das artérias espiraladas uterinas resulta em um ambiente de isquemia-reperfusão placentária. Com isso, ocorre aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando estresse oxidativo e ativação de vias inflamatórias, inclusive do inflamassoma com ativação de NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*). Isso pode causar morte celular e comprometimento da função placentária (BURTON; JAUNIAUX, 2004; C.WEEL et al., 2017; CINDROVA-DAVIES, 2009; HUNG; BURTON, 2006; LI et al., 2020; SCHOOTS et al., 2018; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). A morte celular resulta de danos causados no DNA, nas proteínas e peroxidação lipídica (SCHOOTS et al., 2018). Pelo fato das mitocôndrias, principal fonte de EROs, estarem próximas do retículo endoplasmático (RE), e a depleção de ATP também comprometer a troca de íons cálcio entre o citosol e o RE, também pode ocorrer inativação de chaperonas e comprometimento do enovelamento

proteico, desencadeando estresse de RE (ERE) (BURTON et al., 2009; BURTON; JAUNIAUX, 2011; YUNG et al., 2007). Todas essas alterações celulares estão associadas às disfunções placentárias observadas na pré-eclâmpsia e à restrição de crescimento fetal intrauterino, além de distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade (BURTON; YUNG, 2011; LEE et al., 2019; LIAN et al., 2011; SCHOOTS et al., 2018; SONG et al., 2020; YUNG et al., 2007, 2008, 2014, 2016).

No hipotireoidismo, entretanto, ainda não há estudos que avaliaram essas disfunções celulares na placenta. No entanto, sabe-se que os hormônios tireoidianos são responsáveis por modular o metabolismo e o desenvolvimento placentário e fetal, além de regular o crescimento, a diferenciação e a proliferação celular na interface materno fetal (CHEN; CHEN; LIN, 2015; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa já demonstraram que a hipofunção tireoidiana compromete o desenvolvimento feto-placentário, além de reduzir a migração e a proliferação trofoblástica, como também aumenta a apoptose de células trofoblásticas e compromete o estabelecimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno fetal (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015). Pelo fato do hipotireoidismo causar essas alterações e a redução dos níveis séricos e/ou placentários de kisspeptina observada na diabetes, obesidade, hipertensão e pré-eclâmpsia estar associada ao aborto espontâneo e às disfunções placentárias (ĆETKOVIĆ et al., 2012; HU et al., 2019b; KAPUSTIN et al., 2020; KOŁODZIEJSKI et al., 2018; LOGIE et al., 2012; MATJILA et al., 2016; PARK et al., 2012; SULLIVAN-PYKE et al., 2018), a hipótese principal deste trabalho é que o hipotireoidismo reduz a expressão placentária de kisspeptina, e que a sua administração exógena pode auxiliar na reversão da disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo. Vale ressaltar que a kisspeptina influencia a migração das células trofoblásticas (BILBAN et al., 2004; TAYLOR et al., 2014), sugerindo que este seja um dos meios pelos quais seu menor nível sérico na condição de pré-eclâmpsia afete a função placentária (ADALI et al., 2012; ĆETKOVIĆ et al., 2012; MATJILA et al., 2016).

Sabe-se que os hormônios tireoidianos são capazes também de modular o consumo de oxigênio e a defesa antioxidante, fazendo com que o hipotireoidismo reduza a capacidade antioxidante, resultando em estresse oxidativo em órgãos como fígado, coração, ovário, pâncreas e testículo (CHAKRABARTI et al., 2016;

CHATTOPADHYAY et al., 2007; JEDDI; ZAMAN; GHASEMI, 2016; MANCINI et al., 2016; MENG et al., 2016; SAHOO et al., 2008; SAJADIAN et al., 2016; ZHANG; DONG; SU, 2017). Como nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que o hipotireoidismo materno induz estresse oxidativo e ERE na placenta de ratas (SANTOS et al., 2021), e que a administração exógena de kisspeptina possui efeito antioxidante (ASLAN et al., 2017), outra hipótese deste trabalho é que a administração de kisspeptina possa reverter o estresse oxidativo e o ERE placentários causados pelo hipotireoidismo. É importante ressaltar que até o momento não há estudos que tenham avaliado a expressão de kisspeptina na interface materno-fetal na condição de hipotireoidismo, bem como o seu potencial terapêutico em doenças gestacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o papel da kisspeptina e seu potencial terapêutico na disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo materno.

2.2 Específicos

- Avaliar a expressão gênica e proteica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na decídua e placenta de ratas hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação.
- Avaliar a expressão gênica e proteica de mediadores do estresse oxidativo (HIF α , SOD1, Catalase e GPx1) na interface materno fetal de ratas com hipotireoidismo e tratadas com kisspeptina-10;
- Avaliar a expressão gênica e/ou proteica de mediadores do ERE (GRP78, CHOP e ATF4) na interface materno fetal de ratas com hipotireoidismo e tratadas com kisspeptina-10;
- Avaliar a expressão gênica e/ou proteica de fatores de crescimento (VEGF, PLGF, IGF1, IGF2, GLUT1) e inflamatórios (TNF α , IL-10, IL-6) na interface materno fetal de ratas com hipotireoidismo e tratadas com kisspeptina-10;
- Avaliar a expressão gênica de mediadores da via do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*) e piroptose (*Caspase 1*, *Gasdermina D*) na placenta de ratas com hipotireoidismo e tratadas com kisspeptina-10.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Interface Materno-Fetal

O estabelecimento da gestação e o desenvolvimento saudável do feto requer a formação adequada da interface materno-fetal. A interface materno-fetal é uma estrutura dinâmica constituída basicamente por dois compartimentos, um materno, a decídua, e outro fetal, a placenta. Ambos são de vital importância para a manutenção, desenvolvimento e crescimento fetal, além de estabelecer a interação entre mãe e feto. A decídua regula a invasão trofoblástica, estabelece a tolerância imunológica materna, além de modular a angiogênese e a defesa antioxidante na interface materno-fetal. A placenta, em contrapartida, permite a troca e o fluxo de nutrientes, gases e metabólitos entre a mãe e o feto, além de possuir alta plasticidade e habilidade endócrina que atendem as necessidades fetais e maternas (BURTON; JAUNIAUX, 2015; PLAISIER, 2011; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016; SOARES et al., 2012; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017).

3.1.1 Decidualização em ratas

O processo de decidualização em ratas ocorre após a implantação do embrião (4° ao 6° dia de gestação) (LIU; WANG, 2015; PLAISIER, 2011). O processo se inicia com a fixação do trofoectoderma ao epitélio luminal uterino, que ativa a diferenciação das células estromais endometriais em células deciduais (SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018). Durante esse processo, as células estromais uterinas armazenam glicogênio e aumentam seu volume e a capacidade de secretar diversos fatores de crescimento, sendo esse evento denominado decidualização (REYNOLDS et al., 2010). Além dessas alterações morfofisiológicas, a decidualização inclui a transformação das glândulas uterinas que aumentam sua atividade secretória e são erodidas pelos trofoblastos invasivos e a invasão de células uNKs no endométrio, além de angiogênese e remodelamento vascular (PLAISIER, 2011; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016).

Após a implantação, há aumento na população das células uNKs no endométrio, enquanto ocorre redução nas outras populações de leucócitos no sítio de

implantação. Essas alterações na população celular ocorrem principalmente no triângulo metrial ou glândula metrial, região do endométrio decidualizado da rata, onde ocorre maior invasão trofoblástica e das células uNKs, além do remodelamento vascular. No entanto, com a progressão da gestação, as células uNKs reduzem em número por sofrerem necrose e apoptose à medida que ocorre a migração trofoblástica intrauterina (SOARES et al., 2012; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017) .

As células uNKs pertencem ao sistema imune materno e apresentam fenótipo distinto das células NKs circulantes. Na interface materno-fetal, as células uNKs se acumulam na decídua, mantendo relação próxima com as artérias espiraladas. Elas auxiliam no estabelecimento do fenótipo pseudoendotelial do trofoblasto invasivo, além de ajudar na degradação da túnica média das artérias por mecanismos ainda pouco conhecidos. Todo esse processo permite o remodelamento vascular uterino pelos trofoblastos invasivos e, conseqüentemente, maior fluxo sanguíneo para a interface materno-fetal e para o embrião/feto em desenvolvimento (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016; SOARES et al., 2014).

Fatores como as interleucinas 15 (IL-15) e 11 (IL-11), fator de crescimento transformante β (TGF- β), proteína homeobox Hox-A10 (Hoxa-10), proteína morfogenética óssea (BMP) e a via de sinalização adrenomodulina são essenciais para a manutenção, infiltração e diferenciação das células uNKs, como também para a diferenciação das células deciduais. Além disso, a atividade das células uNKs envolve a produção e liberação de interferon gama (IFN- γ), óxido nítrico, fatores angiogênicos, metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases, que vão modular o desenvolvimento da decídua e, indiretamente, o desenvolvimento da placenta (SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2014).

Durante a gestação, as células uNKs promovem o aumento do influxo de oxigênio no microambiente decidual por aumentar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O aumento do VEGF reduz a via de sinalização do fator induzido por hipóxia (HIF) e, conseqüentemente, aumenta a ativação dos trofoblastos invasivos (CHAKRABORTY et al., 2011; RENAUD et al., 2017; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). Por esse motivo, sabe-se que as células uNKs são cruciais para os processos de placentação e desenvolvimento da interface materno-fetal, uma vez que influenciam a proliferação trofoblástica e seu grau de invasão e migração intrauterina (BURTON; CINDROVA-DAVIES; TURCO, 2020).

3.1.2 Placentação em ratas

A placenta é um órgão de alta plasticidade e capacidade adaptativa, características fundamentais para o sucesso gestacional, além de ser responsável pela troca de nutrientes e oxigênio entre a mãe e o feto. A placenta é um dos principais órgãos endócrinos no período gestacional, pois possui a capacidade de secretar uma ampla variedade de hormônios, citocinas e fatores de crescimento que modulam e regulam a fisiologia materna e fetal. Além disso, realiza as principais funções dos órgãos fetais, como a metabolização de substâncias, produção de hormônios e excreção e eliminação de metabólitos, enquanto os órgãos fetais não estão completamente funcionais. Essa função é vital para permitir o desenvolvimento e crescimento adequado do feto (BURTON; JAUNIAUX, 2015; FOWDEN et al., 2008; SOARES et al., 2014).

A placentação hemocorial, presente em roedores, humanos e primatas não-humanos, é caracterizada pelo contato direto entre os tecidos materno e fetal, no qual os trofoblastos estão em contato direto com o sangue materno, sendo que para isso é necessário um extenso remodelamento vascular (SILVA; SERAKIDES, 2016). Sabe-se que o remodelamento vascular adequado depende da diferenciação, migração e invasão das células trofoblásticas, de modo que o trofoblasto adquira a capacidade de reconhecer, modificar e modular a função das células uterinas (SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018).

A placenta hemocorial definitiva em ratas é formada por volta do 12º dia de gestação, possui o formato discoide e se divide morfológicamente em duas camadas, que se dispõem no sentido da mãe para o feto em: zona juncional, formada pela camada de células gigantes e pelo espongiotrofoblasto; e zona do labirinto (SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012). Ambas as camadas são dependentes da diferenciação adequada do cone ectoplacentário e do ectoderma extraembrionário, estruturas do trofoblasto embrionário que dão origem à placenta definitiva (SILVA; SERAKIDES, 2016).

As células trofoblásticas que formam a placenta definitiva da rata pertencem a diversas linhagens especializadas que exercem funções específicas, sendo elas as células gigantes trofoblásticas, os espongiotrofoblastos, as células de glicogênio, os

trofoblastos invasivos e os sinciciotrofoblastos (SOARES et al., 2012; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018).

Os processos de diferenciação trofoblástica e de placentação se dão a partir do trofoectoderma mural, que dará origem as células gigantes primárias, e ao trofoectoderma polar, que formará o cone ectoplacentário e o ectoderma extraembrionário. A partir do cone ectoplacentário será formada a zona juncional, camada da placenta composta por células gigantes trofoblásticas, por espongiotrofoblastos e por células de glicogênio. Essa camada realiza a função endócrina da placenta, uma vez que é responsável pela síntese e secreção de hormônios, citocinas e fatores de crescimento, além de possuir trofoblastos com capacidade de migração e invasão. O ectoderma extraembrionário, por sua vez, junto com o mesoderma alantoide, formará o labirinto placentário, composto por células-tronco que se diferenciam em células gigantes trofoblásticas labirínticas ou células sinciciais. Enquanto as células gigantes labirínticas possuem função restrita de produção de hormônios, as células sinciciais medeiam a transferência de nutrientes e metabólitos entre a mãe e o feto, uma vez que delimitam os seios vasculares maternos e revestem externamente os capilares fetais junto com o mesênquima fetal (SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018).

Após a formação da placenta definitiva, as células trofoblásticas invasivas se originam na zona juncional e migram para o compartimento mesometrial para realizar o remodelamento vascular uterino. O estímulo para a diferenciação dessa linhagem trofoblástica tem início por volta do 8,5 – 9,5º dia de gestação com a exposição dos trofoblastos a um ambiente de hipóxia, direcionando a diferenciação dessas células para um fenótipo invasivo (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012). Sugere-se que as células de glicogênio, presentes na zona juncional, também sejam precursoras dos trofoblastos invasivos (SOARES et al., 2012). Dentro dessa linhagem, existem os trofoblastos endovasculares, que se localizam no interior dos vasos e substituem o endotélio vascular, e os trofoblastos intersticiais, que migram no estroma endometrial entre os vasos sanguíneos e realizam a invasão perivascular (ROSARIO et al., 2009; SATO, 2020).

3.1.3 Remodelamento vascular

A invasão trofoblástica e o remodelamento das artérias uterinas fazem com que as artérias espiraladas maternas passem de estreitas, tortuosas e rígidas a vasos sanguíneos flácidos, dilatados e sem resposta vasomotora a estímulos maternos. Isso ocorre devido à ação dos trofoblastos invasivos e das células uNKs sobre as artérias e o interstício, que resulta na completa substituição do endotélio vascular por trofoblastos endovasculares, além do desarranjo da musculatura lisa arterial. Essas alterações permitem maior fluxo sanguíneo para a placenta e adequada passagem de nutrientes e oxigênio para o crescimento e desenvolvimento fetal (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003).

O processo de remodelamento vascular é dividido em dois períodos denominados “ondas”. A primeira onda ocorre por volta do 6,5º dia de gestação e é marcada pela maior número de células uNKs no compartimento mesometrial da decidua. Embora ainda não esteja bem estabelecido o papel das células uNKs no remodelamento vascular, sugere-se que elas estimulem a angiogênese, a sensibilização arterial, o início dos mecanismos de morte das células endoteliais, o desarranjo da musculatura lisa e a dilatação do lúmen vascular. Todos esses processos seriam resultantes da secreção de citocinas e fatores de crescimento pelas células uNKs, como VEGF, óxido nítrico, INF γ e IL-15 (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; SOARES et al., 2012; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018). Além disso, estudos mostram que animais com depleção das células uNKs apresentam túnica média intacta, células endoteliais tumefeitas e lúmen vascular estreito (CHAKRABORTY et al., 2011; GUIMOND et al., 1997; RENAUD et al., 2017).

Ainda na primeira onda, os trofoblastos endovasculares iniciam a invasão vascular, sendo esta invasão limitada ao compartimento mesometrial. À medida que vai diminuindo a quantidade de células uNKs na interface materno-fetal, fatores inibidores da invasão trofoblástica secretados pelas células uNKs também reduzem, permitindo o avanço da invasão trofoblástica para além do compartimento mesometrial. Isso permite o início da segunda onda de invasão vascular, que ocorre por volta do 13,5º dia de gestação. Essa onda, há a participação dos trofoblastos endovasculares e intersticiais, cuja invasão se estenderá até o terço médio do

miométrio (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012).

Concomitantemente ao processo de remodelamento vascular, ocorre o remodelamento da matriz extracelular (MEC), sendo esta realizada principalmente pela ação das metaloproteinasas de matriz (MMP) 2, 9, 12 e 14, além do ativador de plasminogênio uroquinase (uPA). Essas proteases degradam a MEC permitindo a invasão e a migração trofoblástica. Com o objetivo de controlar esse processo e não ter invasão excessiva, as células decíduais secretam os inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) e o inibidor de plasminogênio ativado (PAI), cuja função é bloquear a ação das MMPs e do uPA, respectivamente (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2014).

Durante o remodelamento vascular também ocorre o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal, em que os trofoblastos endovasculares reduzem a expressão de moléculas de adesão, como E-caderina, e aumentam a expressão de PECAM, VECAM-1 e integrinas $\alpha 4$. Isso faz com que os trofoblastos adquiram um fenótipo pseudoendotelial e permite que os mesmos substituam o endotélio arterial após a invasão intraluminal (CHAKRABORTY et al., 2016; KNÖFLER, 2010; SILVA, SERAKIDES, 2016).

Falhas na migração trofoblástica e no remodelamento vascular estão associadas ao desenvolvimento de complicações gestacionais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, placenta creta, prematuridade, doença trofoblástica gestacional e morte materna e/ou fetal (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; SILVA; SERAKIDES, 2016).

3.1.4 Regulação da invasão e migração trofoblástica

Diversas moléculas secretadas no microambiente decidual pelas células decíduais, pelas células uNKs e até mesmo pelas próprias células trofoblásticas regulam a invasão e a migração trofoblástica (KNÖFLER, 2010). Entre essas moléculas regulatórias estão os fatores de crescimento como VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento placentário (PLGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator estimulador de colônias 1 (CSF-1) e os fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo 1 (IGF-1) e tipo 2 (IGF-2). Todos

esses mediadores estimulam a proliferação, a adesão e a invasão trofoblásticas. Além deles, também há mediadores imunológicos como as quimiocinas (CXCL1, CCL14, CXCL-16 e CCL21), as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-11) e o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), que estimulam a invasão trofoblástica, enquanto TGF- β e INF- γ apresentam atividade inibitória. Hormônios placentários como o estradiol e a progesterona também regulam indiretamente a migração trofoblástica, com ação estimulatória e inibitória, respectivamente (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; KNÖFLER, 2010; SILVA; SERAKIDES, 2016).

O teor de oxigênio também é um forte regulador da invasão trofoblástica, à medida que o ambiente de hipóxia ativa a diferenciação trofoblástica para linhagens invasivas via sinalização do HIF, além de ativar a transição epitélio-mesenquimal dos trofoblastos endovasculares (SOARES et al., 2014; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). A ativação do HIF resulta em respostas adaptativas com o objetivo de aumentar a vascularização mesometrial, o remodelamento vascular e a diferenciação trofoblástica para o fenótipo invasivo, promovendo maior invasão trofoblástica (SOARES et al., 2014). Fisiologicamente, no início do primeiro trimestre gestacional em humanos, o microambiente da interface materno-fetal se encontra com baixos níveis de oxigênio (1-2%), o que promove a diferenciação trofoblástica para a linhagem invasiva. No decorrer da gestação, com o estabelecimento da placentação hemocorial, o nível de oxigênio aumenta na interface materno-fetal, reduzindo a diferenciação para o fenótipo invasivo e controlando o grau de invasão trofoblástica. Atraso no estabelecimento desse ambiente de hipóxia ou exposição excessiva a um ambiente de hipóxia pode causar invasão superficial ou extensa invasão, que estão associadas a diversas complicações gestacionais (SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017).

Além dos mediadores citados que influenciam a migração trofoblástica intrauterina, a kisspeptina também tem se mostrado como importante regulador da invasão trofoblástica, via ligação ao seu receptor Kiss1R. Na placenta, o sistema Kisspeptina/Kiss1R é expresso pelas células gigantes trofoblásticas invasivas, sugerindo possível ação autócrina desse peptídeo nestas células. Além disso, o pico de expressão de kisspeptina na placenta da rata coincide com o período de intensa invasão trofoblástica, ou seja, 12,5 dias de gestação. Esse é um período em que a invasão trofoblástica precisa estar finamente regulada, uma vez que se formou a placenta definitiva e começa a invasão trofoblástica endovascular e intersticial. Com

o decorrer da gestação, a invasão trofoblástica diminui, tornando-se praticamente ausente no final da gestação, período em que a expressão proteica de kisspeptina é indetectável (HIDEN et al., 2007; SILVA; SERAKIDES, 2016). Estudos *in vitro* demonstraram que a kisspeptina reduz a migração e a invasão de células trofoblásticas ao regular negativamente a expressão de metaloproteinasas e do VEGF e aumentar a adesão trofoblástica e a expressão de TIMPs (BILBAN et al., 2004; FRANCIS et al., 2014; TAYLOR et al., 2014).

3.2 Kisspeptina e gestação

A kisspeptina, codificada pelo gene *Kiss1*, foi originalmente descoberta como um gene supressor de metástase (OHTAKI et al., 2001). No entanto, é considerada atualmente o neuropeptídeo chave da reprodução por estimular o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal via receptor 54 acoplado à proteína Gq (GPR54), também conhecido como KISS1R. Os neurônios kisspeptinérgicos do hipotálamo agem diretamente sobre os neurônios que secretam o GnRH, ativando o eixo GnRH/gonadotrofina e, conseqüentemente, a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), pela adenohipófise. Por isso, a kisspeptina é considerada essencial para a ativação da puberdade e manutenção das funções reprodutivas (FRANCIS et al., 2014; NAVARRO, 2020).

Além da sua ação central, o sistema kisspeptina/Kiss1R é expresso em outros tecidos como no coração, tecido adiposo, pâncreas, fígado, intestino delgado, testículo, ovário, linfonodo e vasos sanguíneos, sugerindo que falhas na sinalização sistêmica de kisspeptina podem também afetar o funcionamento adequado de outros sistemas. Nesse sentido, já foi demonstrado que a placenta é a principal fonte da kisspeptina sistêmica, em mulheres gestantes, além do seu receptor apresentar forte expressão no tecido placentário, sugerindo que sua ação neste órgão seja vital para a gestação (KOTANI et al., 2019; NAVARRO, 2020; ROA; TENA-SEMPERE, 2007).

Durante a gestação, os níveis de kisspeptina plasmática aumentam drasticamente, cerca de 10.000 vezes quando comparados ao estado não gestacional, reduzindo após o parto. Além disso, o aumento de kisspeptina está associado ao aumento de outros hormônios placentários como prolactina, estrógeno e progesterona (CASTELLANO et al., 2006; DUDEK et al., 2016; HORIKOSHI et al., 2003; KOTANI et

al., 2019; MAGUIRE et al., 2011; REYNOLDS et al., 2009). Embora os níveis de kisspeptina na urina sejam menores do que os níveis plasmáticos, mulheres gestantes também possuem níveis urinários de kisspeptina maiores do que mulheres não gestantes (HORIKOSHI et al., 2003).

Na placenta de mulheres e ratas, a kisspeptina e o Kiss1R são expressos nos sinciotrofoblastos e nas células gigantes trofoblásticas, células com alta atividade endócrina e responsáveis pela secreção da maioria dos hormônios placentários e dos fatores de crescimento que modulam o metabolismo materno e o desenvolvimento placentário, bem como o crescimento e o desenvolvimento fetal (JAYASENA et al., 2015). Por isso, sugere-se que a kisspeptina seja importante para a regulação do metabolismo materno e para o desenvolvimento placentário e fetal (KOTANI et al., 2019; NAVARRO, 2020; ROA; TENA-SEMPERE, 2007).

Embora as funções da kisspeptina durante a gestação não estejam bem estabelecidas, estudos sugerem que além da sua participação na placentação (BILBAN et al., 2004; TERAO et al., 2004), influenciando a migração trofoblástica, a kisspeptina possa ser essencial no processo de decidualização. PARK et al. (2012) demonstraram aumento na expressão do sistema kisspeptina/Kiss1R ao longo da decidualização de células estromais *in vitro* e que o silenciamento de *Kiss1* bloqueava a decidualização dessas células. Além disso, camundongos nocautes para *Kiss1* apresentam menor expressão uterina do fator inibidor da leucemia (LIF) (HU et al., 2019a; RADOVICK; BABWAH, 2019; ZHANG et al., 2014), um fator secretado pelas glândulas uterinas e que é vital para a implantação embrionária e decidualização (CALDER et al., 2014).

SHIRSHEV et al. (2015) também demonstraram *in vitro* que kisspeptina estimula a diferenciação das células *natural killers* (NKs) tipo 1 isoladas do sangue periférico de mulheres não-gestantes em células NKs tipo 3, além de suprimir a expressão de IL-4, de IL-10 e de IFN γ e aumentar a produção de TGF- β , um facilitador da transformação das células NKs periféricas em células NKs deciduais. Também foi demonstrado *in vitro* que kisspeptina em células mononucleares do sangue periférico de mulheres hígdas favorece a formação de linfócitos T regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL-10 e redução de IL-17, sugerindo que a kisspeptina possa contribuir para a formação da tolerância

imunológica na interface materno-fetal durante a gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

Além desses efeitos na fisiologia materna, estudos também têm sugerido a kisspeptina como um potencial biomarcador sérico do sucesso gestacional (CALDER et al., 2014; FAYAZI et al., 2015), uma vez que redução dos níveis plasmáticos de kisspeptina tem sido associada à ocorrência de pré-eclâmpsia, principalmente em quadros mais graves (HU et al., 2019b; SULLIVAN-PYKE et al., 2018), nascimento de neonatos com baixo peso para a idade gestacional (SGA – *Small for Gestational Age*) (ADALI et al., 2012; ZIYARAA; HAMDAN; MOUSA, 2016), restrição do crescimento fetal (SMETS et al., 2008), diabetes e hipertensão gestacional (ARMSTRONG et al., 2009). Além disso, alteração na expressão placentária do sistema Kiss1/Kiss1R tem sido observada na pré-eclâmpsia (CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012), no aborto espontâneo recorrente (COLAK et al., 2020) e no diabetes gestacional (KAPUSTIN et al., 2020). Porém, ainda não está claro se a alteração da expressão placentária de kisspeptina é uma causa primária das complicações gestacionais ou efeito secundário da disfunção placentária (KAPUSTIN et al., 2020).

Embora estudos tenham demonstrado que disfunções placentárias decorrentes de distúrbios cardiometabólicos como os que ocorrem no diabetes gestacional (ĆETKOVIĆ et al., 2012; KAPUSTIN et al., 2020), na obesidade (KAPUSTIN et al., 2020; KOŁODZIEJSKI et al., 2018; LOGIE et al., 2012) e na hipertensão (ĆETKOVIĆ et al., 2012) estão associadas com redução dos níveis plasmáticos e/ou placentários de kisspeptina, ainda não há estudos que avaliaram o perfil de expressão do sistema kisspeptina/Kiss1R na disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno.

3.3 Hipotireoidismo Materno

Os hormônios tireoidianos são capazes de agir de forma direta no tecido placentário através de receptores nucleares e de forma indireta por meio da interação com outros hormônios e fatores de crescimento como estrógeno, progesterona e IGF. Essas interações e a ativação dos receptores nucleares modulam o metabolismo e o desenvolvimento placentário, bem como o crescimento, diferenciação e proliferação celular, além da sobrevivência e da função endócrina das células trofoblásticas (CHEN; CHEN; LIN, 2015; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Além disso, os hormônios tireoidianos maternos também exercem efeitos sobre os tecidos fetais durante a 6-12ª semana de gestação em humanos e até o 17º dia de gestação na rata, sendo capazes de modular o metabolismo fetal até que o feto seja capaz de produzir seus próprios hormônios tireoidianos (CHEN; CHEN; LIN, 2015; JAMES; FRANKLYN; KILBY, 2007; SILVA; SERAKIDES, 2016).

A hipofunção tireoidiana materna está associada com complicações gestacionais como aborto, parto prematuro, pré-eclâmpsia e morte fetal, sendo que modelos experimentais utilizando ratas com hipotireoidismo demonstraram que essas alterações gestacionais estão associadas às disfunções placentária e decidual (BELET et al., 2003; CHEN; CHEN; LIN, 2015; KURLAK et al., 2013; SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015, 2018). O hipotireoidismo materno compromete a morfogênese placentária e o estabelecimento do ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal, além de reduzir a proliferação e a migração trofoblástica intrauterina e aumentar a apoptose. Além disso, o hipotireoidismo compromete a vascularização placentária e decidual, a população de células uNKs DBA+, além da expressão de genes chave associados à atividade angiogênica e hormonal placentária, como o VEGF, o PLGF e o lactogênio placentário 1 (PL1) (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015, 2017, 2018; SOUZA et al., 2020).

Pelo fato da redução da migração trofoblástica intrauterina e das alterações na angiogênese decidual estarem associadas à ocorrência de estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na placenta de mulheres com pré-eclâmpsia e à restrição do crescimento fetal, sugere-se que o mesmo possa ocorrer na placenta de ratas e mulheres com hipotireoidismo, uma vez que a redução da migração

trofoblástica observada na placenta de ratas poderia comprometer o remodelamento vascular uterino e causar um ambiente de isquemia-reperfusão. Além disso, ratas com hipotireoidismo apresentam redução da expressão placentária da IL-10 e da óxido nítrico sintetase-2 (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014). A redução desses fatores na interface materno-fetal está associada ao estresse oxidativo placentário, causando aborto, parto prematuro e pré-eclâmpsia, além da IL-10 estar envolvida no controle da hipertensão e da disfunção endotelial sistêmica observada na pré-eclâmpsia (HARMON et al., 2015; KALKUNTE et al., 2011; LAI; KALKUNTE; SHARMA, 2011). Nesse sentido, recente estudo da nossa equipe demonstrou que o hipotireoidismo causa estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na placenta de ratas (SANTOS et al., 2021).

Uma vez que os hormônios tireoidianos são requisitados para a manutenção da taxa metabólica, do consumo de oxigênio e da composição lipídica nos tecidos, estudos já demonstraram que o hipotireoidismo causa também aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica em diversos outros tecidos (CHAKRABARTI et al., 2016; CHEN; CHEN; LIN, 2015; MANCINI et al., 2016; SAHOO et al., 2008) . No entanto, é importante ressaltar que a ocorrência de estresse placentário também pode aumentar a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias por ativação de vias de sinalização associados ao estresse e à inflamação, como o fator nuclear- κ B (Nf- κ B) e a proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38 MAP quinase), afetando a função placentária (AOUACHE et al., 2018; CINDROVA-DAVIES et al., 2007).

Além da ativação das vias clássicas de inflamação, como o Nf- κ B (CINDROVA-DAVIES et al., 2007; ZHANG, 2010), o estresse de retículo endoplasmático também está associado a outras vias de inflamação estéril, como a via do inflamassoma NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) (LI et al., 2020) . Recentes estudos demonstraram que há aumento da expressão de NLRP3 no coração de ratos com hipotireoidismo (SAHIN et al., 2019), como também na placenta de mulheres com diabetes gestacional (CORRÊA-SILVA et al., 2018).

3.4 Nlrp3 Inflamassoma e Piroptose

O estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático são capazes de ativar o complexo inflamassoma NLRP3, por meio da dissociação da proteína que

interage com a tioredoxina (*TXNIP-thioredoxin-interacting protein*), promovendo a integração entre o estresse celular e a resposta imune inata (LI et al., 2020).

Em diversas condições patológicas, o complexo inflamassoma NLRP3 é ativado pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs-*damage-associated molecular pattern*) ou a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs-*Pathogen-associated molecular pattern*). O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico composto pelo receptor intracelular da imunidade inata NLRP3, proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) e a pró-caspase-1, que será clivada em caspase-1. Essa clivagem também é necessária para a sinalização da clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas respectivas formas maduras, IL-1 β e IL-18, com sua posterior liberação (JO et al., 2016; LI et al., 2020). No entanto, a ativação de caspase-1 via inflamassoma também pode desencadear a ocorrência de piroptose, um processo de morte celular programada (FANG et al., 2020).

A piroptose é ativada por uma variedade de DAMPs e PAMPs que ativam a formação do complexo inflamassoma, com consequente maturação de IL-1 β e IL-18 e clivagem da pro-caspase-1. A caspase-1 sinaliza a clivagem de gasdemina D que formará poros na membrana plasmática, resultando em influxo de água, tumefação e lise da membrana plasmática. A lise da célula causa a liberação de IL-1 β , IL-18 e DAMPs, ativando um quadro de inflamação estéril (CHENG et al., 2019; FANG et al., 2020). Nesse sentido, recentes estudos demonstraram que os estresses celulares desencadeados pela hipóxia na placenta pré-eclâmptica são capazes de ativar a via TXNIP-inflamassoma NLRP3, inclusive a ativação de piroptose com liberação de interleucinas e DAMPs na circulação materna (C.WEEL et al., 2017; CHENG et al., 2019; GAO et al., 2020; GOMEZ-LOPEZ et al., 2019; LIU et al., 2019). No entanto, até o momento, não há estudos avaliando se o hipotireoidismo pode causar piroptose e, particularmente, se as alterações placentárias observadas no hipotireoidismo materno estão associadas à ativação do inflamassoma NLRP3. Estudar a ocorrência desses dois processos em modelos de disfunção placentária causada por hipotireoidismo é importante para a melhor compreensão da doença e o estabelecimento de novos alvos terapêuticos para essa disfunção gestacional.

4 CAPÍTULO I

TRATAMENTO COM KISSPEPTINA MELHORA O DESENVOLVIMENTO FETO- PLACENTÁRIO DE RATAS HIPOTIREOIDEAS

4.1 Introdução

A kisspeptina, codificada pelo gene *Kiss1*, foi purificada primeiramente a partir da placenta humana (KOTANI et al., 2019; OHTAKI et al., 2001). Logo após a sua descoberta, ela foi reconhecida como essencial para a fertilidade, por regular a produção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), por meio do receptor acoplado à proteína G GPR54 (Kiss1R), seu receptor cognato. Por isso, falhas na sinalização do sistema kisspeptina/Kiss1R resultam em hipogonadismo hipogonadotrófico (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). No entanto, além de sua ação hipotalâmica, como a regulação dos neurônios GnRH, o sistema kisspeptina/Kiss1R é expresso em uma variedade de tecidos, incluindo a placenta (CAO et al., 2019; D'OCCHIO; CAMPANILE; BARUSELLI, 2020). No entanto, estudos sobre a ação da kisspeptina na placenta ainda são escassos.

Em humanos, os níveis circulantes de kisspeptina são baixos na maioria das condições fisiológicas, exceto no terço final da gestação de mulheres, quando esses níveis aumentam quase 10.000 vezes, retornando rapidamente ao nível basal após o parto (HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018; HIDEN et al., 2007; HU et al., 2019b). Esses resultados sugerem a placenta como uma das principais fontes de kisspeptina. Além disso, outros estudos já demonstraram a importância da kisspeptina para a adesão e implantação do blastocisto, além de auxiliar na decidualização e regular o perfil imunológico e das células *natural killers* uterinas (uNKs) na interface materno-fetal (CAO et al., 2019; FAYAZI et al., 2015; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014; HIDEN et al., 2007; HU et al., 2019a, 2019b; PARK et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

No entanto, além do papel fisiológico da kisspeptina na interface materno-fetal, ela também está envolvida em distúrbios placentários. A avaliação do seu perfil plasmático tem sido inclusive sugerida como um fator preditivo do sucesso gestacional (HU et al., 2019b; SULLIVAN-PYKE et al., 2018), uma vez que alteração dos níveis

plasmáticos e/ou placentários de kisspeptina já foram observados em doenças gestacionais, como pré-eclâmpsia, aborto espontâneo, diabetes gestacional e obesidade (ADALI et al., 2012; ARMSTRONG et al., 2009; CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; ĆETKOVIĆ et al., 2012; COLAK et al., 2020; KAPUSTIN et al., 2020; KOŁODZIEJSKI et al., 2018; LI et al., 2017; LOGIE et al., 2012; MATJILA et al., 2016; PARK et al., 2012; SULLIVAN-PYKE et al., 2018; WU et al., 2014). Apesar do hipotireoidismo, à semelhança das doenças citadas anteriormente, também ser uma doença metabólica gestacional importante que afeta o desenvolvimento feto-placentário (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018), ainda não há estudos sobre o sistema kisspeptina/Kiss1R na placenta de ratas com hipotireoidismo durante a gestação.

Mulheres com hipotireoidismo materno apresentam maior chance de sofrer aborto espontâneo e restrição do crescimento intrauterino (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Além disso, os níveis plasmáticos de T3 e T4 estão baixos em pacientes com pré-eclâmpsia (KURLAK et al., 2013; NEWBERN; FREEMARK, 2011). Ao longo de vários anos, nossa equipe vem demonstrando, por meio de vários estudos, que o hipotireoidismo em ratas reduz a proliferação e a migração trofoblástica intrauterina, aumenta a apoptose na placenta, compromete a morfogênese e a vascularização placentária e altera o perfil imunológico e a população de células uNKs na interface materno-fetal (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015, 2017, 2018; SOUZA et al., 2020). Apesar da kisspeptina influenciar grande parte dos processos placentários que são alterados pelo hipotireoidismo materno, como o processo de angiogênese, a imunologia placentária (FRANCIS et al., 2014; GOLZAR; JAVANMARD; DANA, 2014; RAMAESH et al., 2010) e a migração e a invasão trofoblástica na interface materno-fetal (HIDEN et al., 2007; ROSEWEIR; KATZ; MILLAR, 2012), este parece ser o primeiro estudo que investigou o papel da kisspeptina na disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno.

Estudo recente da nossa equipe também demonstrou que o hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na placenta de ratas (SANTOS et al., 2021). O efeito antioxidante da kisspeptina já foi testado no ovário (ASLAN et al., 2017), no fígado (AYDIN et al., 2010) e no testículo (AKKAYA et

al., 2017), mas essa é a primeira vez que o efeito antioxidante da kisspeptina é avaliado também na placenta.

O estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático são insultos celulares que além de desencadear a inflamação via ativação de Nf- κ B (BURTON; JAUNIAUX, 2011; CINDROVA-DAVIES et al., 2007; ZHANG, 2010), também ativam a formação de inflamassoma, principalmente pela via NLRP3, levando à clivagem e maturação de caspase 1, IL-1 β e IL-18 (LI et al., 2020). Além disso, a via de inflamassoma também pode levar a ativação de piroptose, uma vez que a caspase 1 cliva a proteína gasdemina D e resulta em morte celular e inflamação estéril (FANG et al., 2020; JO et al., 2016) . Embora a ativação do inflamassoma NLRP3 e piroptose também estejam envolvidos na patogênese da pré-eclâmpsia, complicação gestacional que também apresenta falha na migração trofoblástica, restrição de crescimento fetal e estresse oxidativo e reticular (BURTON et al., 2019; C.WEEL et al., 2017; CHENG et al., 2019; FISHER, 2015; LIU et al., 2019; RANA et al., 2019; TAO et al., 2020; XIE et al., 2010; YANG et al., 2020) , estudos sobre esses processos na condição de hipotireoidismo e sua relação com a kisspeptina ainda não foram realizados. Por isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel da kisspeptina e seu potencial terapêutico na disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo materno.

Nós demonstramos que a restrição de crescimento feto-placentária observada em ratas com hipotireoidismo materno está associada com a redução do sistema kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal. Além disso, o tratamento diário com Kp10 em ratas gestantes hipotireoideas não somente melhora o desenvolvimento feto-placentário e a vascularização placentária, como aumenta a expressão de fatores de crescimento e enzimas antioxidantes e bloqueia a ativação do inflamassoma causado pelo hipotireoidismo. Este é o primeiro estudo a avaliar a expressão do sistema kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal na condição de hipotireoidismo materno, bem como o potencial terapêutico de kisspeptina em uma doença gestacional.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas (6 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UESC (Protocolo 002/17).

4.2.2 Delineamento experimental

Experimento 1: Perfil de expressão do sistema Kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas

Ratas Wistar adultas (200-250 gramas) foram distribuídas igualmente nos grupos eutireoideo (controle) e hipotireoideo.

O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária, por sonda orogástrica, de 6-propyl-2-thiouracil (4 mg/Kg/dia) que iniciou-se cinco dias antes do acasalamento e o controle recebeu água como placebo (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Os animais foram eutanasiados no dia 0 de gestação (5-6 animais/grupo), para dosagem de T3 e T4 livre, e com 14 e 18 dias de gestação (6-7 animais/grupo), para avaliação do desenvolvimento feto-placentário, da histomorfometria placentária e da expressão proteica e gênica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na decídua e placenta por imuno-histoquímica e qRT-PCR.

Experimento 2: Potencial terapêutico de kisspeptina-10 na disfunção placentária de ratas hipotireoideas

Ratas Wistar adultas (200-250 gramas) foram distribuídas igualmente nos grupos eutireoideo (controle) (n=8), hipotireoideo (n=8) e hipotireoideo tratado com

kisspeptina-10 (Kp10) dia sim/dia não (KpT1; N=8) ou todos os dias (KpT2; n=8). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária, por sonda orogástrica, de 6-propyl-2-thiouracil (4 mg/Kg/dia) que iniciou-se cinco dias antes do acasalamento e o controle recebeu água como placebo (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

O tratamento com Kp10 (8 µg/Kg/dia/IP) iniciou-se no 8º dia de gestação, enquanto os outros animais receberam água estéril como placebo. No dia 0 de gestação e no dia da eutanásia foi avaliado o peso corporal das ratas para o cálculo do ganho de peso durante a gestação. Os animais foram eutanasiados com 18 dias de gestação e os discos placentários e fetos foram coletados para avaliação do desenvolvimento feto-placentário, da histomorfometria placentária e da expressão placentária de mediadores antioxidantes (Sod1, Catalase, Gpx1), de hipóxia (Hif1α), de estresse reticular (Grp78, Chop, ATF4), de fatores de crescimento (Igf1, Igf2, Vegf e Plgf), de transportadores placentários (Glut1) e de mediadores imunológicos (Il-10, Tnf, Il-6) e da via do inflamassoma (Il-1β, Il-18, Nlrp3) e piroptose (Caspase 1, Gasdermina D) por imuno-histoquímica e/ou qRT-PCR.

4.2.3 Manejo animal e Indução do hipotireoidismo

Após um período de 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas aleatoriamente nos grupos controle, hipotireoideo ou hipotireoideo tratado com Kp10 de acordo com o Experimento 1 ou 2. O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária por sonda orogástrica de 4 mg/Kg/dia de 6-propil-2-tiouracil (PTU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que iniciou-se 5 dias antes do acasalamento, e os animais controle receberam água como placebo (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014)

Após cinco dias do início do tratamento com PTU, as ratas em proestro, confirmado por citologia vaginal, foram alojadas com machos adultos férteis para o acasalamento. A presença de espermatozoides na citologia vaginal, na manhã seguinte, confirmou a cópula e foi definido como dia 0 de gestação (0 DG).

4.2.4 Tratamento com kisspeptina-10 (Kp10)

Os animais hipotireoideos tratados com Kp10 foram distribuídos em dois grupos, um que foi tratado dia sim/dia não (KpT1) e outro tratado diariamente com Kp10 (KpT2). O tratamento foi iniciado no 8º DG, com a dose de 8 µg/Kg/dia (Cat. No. 4243, Tocris Bioscience, Bristol, UK), por via intraperitoneal. Os animais do grupo controle e hipotireoideo receberam água estéril como placebo.

4.2.5 Eutanásia e Coleta de Material

As eutanásias foram realizadas por decapitação, com coleta de sangue da cervical em tubos com heparina. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 min para obtenção do plasma que foi armazenado a -20°C.

Na necropsia foi coletado todo o sistema genital. Posteriormente, foi pesado o útero contendo a placenta e os fetos; útero com placenta; e todos os fetos individualmente. Um valor estimado do peso do líquido amniótico também foi obtido após subtrair o peso do útero e placenta com os fetos do peso dos fetos e do peso útero e placenta sem os fetos. Foram também contabilizados o número de fetos e o número de sítios com reabsorção ou morte fetal. Fragmentos de placenta e decídua+triângulo metrial foram dissecados e retirados de dois sítios placentários/animal e imersos em Trizol separadamente, seguido de congelamento em nitrogênio líquido e estocagem a -80°C para análises de qRT-PCR. Os discos restantes (placenta+decídua+triângulo metrial) foram fixados em paraformaldeído 4% à 4°C por 24 horas e processados pela técnica de inclusão em parafina para análise histomorfométrica e imuno-histoquímica. Os tecidos foram desidratados em solução seriada de álcool 70% até 100%, com posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Cortes de 4µm dos tecidos foram obtidos pela microtomia em lâminas histológicas para avaliação histomorfométrica. Para imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

4.2.6 Análise hormonal

No dia 0 de gestação, seis animais de cada grupo do Experimento 1 foram eutanasiados com guilhotina para coleta do sangue com heparina. O plasma foi obtido após centrifugação a 3000 rpm por 20 min e armazenado a -20°C para dosagem de T3 e T4 livre e confirmação da indução do hipotireoidismo. A dosagem foi realizada por meio de ELISA (sensibilidade: 0,4 ng/dL), com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, USA). Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram de 4 and 7%, respectivamente.

4.2.7 Avaliação do desenvolvimento fetal

O cérebro, coração, fígado, pulmões e rins de cada feto foram também dissecados, pesados e foi obtido o peso relativo dos órgãos em relação ao peso fetal. Após pesagens dos órgãos fetais foi calculado a relação cérebro/fígado, um indicador de restrição de crescimento fetal assimétrica (NAPSO et al., 2019).

4.2.8 Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica da interface materno-fetal (decídua+placenta) foi realizada em cortes histológicos de 4µm corados com Hematoxilina e Eosina. A avaliação quantitativa foi realizada em 7-8 discos placentários/grupo, sendo obtido um corte histológico/disco placentário que foi feito no centro do tecido de forma que pegasse o vaso sanguíneo materno central e, desse modo, uniformizasse os cortes histológicos. Imagens de cada disco placentário foram capturadas utilizando um estereomicroscópio *Leica S9i* e a espessura de cada camada da placenta (zona juncional e zona de labirinto) foi avaliada em 10 regiões aleatórias e obtida a média por sítio placentário. As análises foram realizadas com o auxílio do software *Image Pro Plus®* versão 4.5 e os valores foram transformados para milímetros com o auxílio de uma escala micrométrica.

Na zona juncional foi avaliada a proporção de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes trofoblásticas por campo,

selecionando 5 campos aleatórios com a objetiva de 20x. Na zona de labirinto foi avaliada a proporção de área ocupada por seio vascular materno, capilares fetais e mesênquima fetal/ células trofoblásticas por campo, selecionando 10 campos aleatórios da região superior (5) e inferior (5) do labirinto com a objetiva de 40x. As imagens foram capturadas em um Microscópio fotônico *Leica DM2500* e para a quantificação foi utilizada uma grátula de 99 (zona juncional) e 100 (zona de labirinto) pontos com auxílio do software *Image Pro Plus®* versão 4.5 (SILVA et al., 2012).

4.2.9 Imuno-histoquímica

Secções histológicas dos discos placentários foram submetidas à análise imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-Kiss1 (sc-101246, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-Kiss1R (HPA071913, Sigma, Saint Louis, USA), anti-HIF α (sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-SOD1 (sc-101523, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-catalase (sc-271803, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GPx 1/2 (sc-133160, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GRP78 (sc-13539, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CHOP (sc-71136, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-ATF4 (sc-390063, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-TNF α (sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-IL-10 (sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-VEGF (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (NOVOLINK-POLYMER-DETECTION-SYSTEMS, Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho maria a 98°C, utilizando solução de ácido cítrico com pH 6,0. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 18 ou 40 horas com o anticorpo primário (Tabela 1) e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio e estreptavidina peroxidase. O cromógeno foi a diaminobenzidina (EnVision FLEX DAB+ Chromogen, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) incubado em tempos específicos para cada anticorpo primário (Tabela 1). As secções foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução de fosfato tamponada (PBS) (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Foi realizada a avaliação descritiva e quantitativa da expressão imuno-

histoquímica de Kiss1, Kiss1R, HIF α , SOD1, Catalase, GPx, GRP78, CHOP, ATF4, VEGF, TNF α e IL-10 nas camadas de zona juncional e labirinto placentário. A avaliação quantitativa foi realizada aleatoriamente em seis discos placentários/grupo. Imagens de 5 campos aleatórios em cada região do disco placentário foram obtidas com um Microscópio fotônico *Leica DMI 300B* (Leica Microsystems, Germany) com a objetiva 40x. Para Kiss1 e Kiss1R foram avaliadas as regiões de triângulo Metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto, enquanto para os demais marcadores foram avaliadas as regiões de zona juncional e labirinto placentário. A área de imunomarcção foi determinada por meio do software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Para a análise da camada de células gigantes foram selecionadas áreas de 9,07 mm² (largura, 133,33 μ m; comprimento, 68,03 μ m) para delimitar a área em que a imunomarcção foi analisada. Color *deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada disco placentário foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Tabela 1: Anticorpos utilizados com suas respectivas diluições e tempos de incubação e revelação.

Anticorpo	Espécie/Clone	Diluição	Tempo de incubação	Tempo de revelação
Anti-Kiss1	Camundongo/Monoclonal	1:100	40 horas	5 minutos
Anti-Kiss1R	Coelho/Policlinal	1:300	40 horas	30 minutos
Anti-HIF α	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	4 minutos
Anti-SOD1	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	15 segundos
Anti-Catalase	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	1 minuto
Anti-GPx 1/2	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	40 segundos
Anti-GRP78	Rato/Monoclonal	1:1000	18 horas	4 minutos
Anti-CHOP	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	14 minutos
Anti-ATF4	Camundongo/Monoclonal	1:1000	18 horas	4 minutos
Anti-TNF α	Camundongo/Monoclonal	1:500	18 horas	3 minutos
Anti-IL-10	Camundongo/Monoclonal	1:6000	18 horas	30 minutos
Anti-VEGF	Coelho/Policlinal	1:200	40 horas	12 minutos

4.2.10 qRT-PCR

Para a técnica de qRT-PCR, a extração do RNA total da decídua e da placenta foi feita pelo uso do Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O método consistiu em uma etapa inicial de lise e homogeneização do tecido por 5 minutos à temperatura ambiente para completa

dissociação dos complexos nucleoproteicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, 2 a 3 minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4 °C para separação em três fases, onde a fase incolor superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase incolor foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à -80 °C, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4 °C para precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi colocado no gelo. Os pellets foram lavados com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizados e centrifugados a 10.500g por 5 minutos a 4 °C. Após o descarte do etanol, o pellet de RNA foi solubilizado em água livre de RNase e DNase e imediatamente estocado à -80 °C. A análise da concentração e da qualidade do RNA de cada tecido foi feita utilizando nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific).

Foi utilizado 1µg de RNA para as reações de transcrição reversa utilizando o kit comercial GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Para as reações, foi utilizado 1,5 µL de cDNA, 100 nM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Para avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores para *Kiss1*, *Kiss1r*, *Sod1*, *Catalase*, *Gpx1*, *Hif1α*, *Grp78*, *Chop*, *Il-10*, *Tnf*, *Il-6*, *Il-1β*, *Nlrp3*, *Caspase 1*, *Gasdermina D*, *Igf1*, *Igf2*, *Glut1*, *Vegf* e *Plgf* foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 2). A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de *Polr2a Rattus norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SOLANO et al., 2016).

Tabela 2 Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores	Nº acesso
<i>Kiss1</i>	F: GAGCCACTGGCAAAAATGGC R: ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC	NM_181692.1
<i>Kiss1r</i>	F: CAACCTGCTGGCCCTATACC R: TGCAGGGCGCCATCAGT	NM_023992.2
<i>Sod1</i>	F: GAAAGGACGGTGTGGCCAAT R: CTCGTGGACCACCATAGTACG	NM_017050.1
<i>Hifa</i>	F: AGCAATTCTCCAAGCCCTCC R: TTCATCAGTGGTGGCAGTTG	NM_024359.1
<i>Catalase</i>	F: CTGACTGACGCGATTGCCTA R: GTGGTCAGGACATCGGGTTT	NM_012520.2 R
<i>Gpx1</i>	F: GCGCTACAGCGGATTTTTGA R: GAAGGCATACACGGTGGACT	NM_030826.4
<i>Grp78</i>	F: TGAAGGGGAGCGTCTGATTG R: TCATTCCAAGTGCGTCCGAT	NM_013083.2
<i>Chop</i>	F: TGGCACAGCTTGCTGAAGAG R: TCAGGCGCTCGATTTCT	NM_001109986.1
<i>Il10</i>	F: GGCCATTCCATCCGGGGTGA R: AAGGCAGCCCTCAGCTCTCG	NM_012854.2
<i>Tnfa</i>	F: AGCCCGTAGCCCACGTCGTA R: CGGTGTGGGTGAGGAGCACG	NM_012675.3
<i>Il6</i>	F: GACTTCCAGCCAGTTGCCTT R: AAGTCTCCTCTCCGACTTGT	NM_053595.2
<i>Il18</i>	F: ACCACTTTGGCAGACTTCACT R: ACACAGGCGGGTTTCTTTTG	NM_019165.1
<i>Il1β</i>	F: GCACAGTTCCCCAACTGGTA R: TGTCCCGACCATTGCTGTTT	NM_031512.2
<i>Nlrp3</i>	F: CTCTGCATGCCGTATCTGGT R: GTCCTGAGCCATGGAAGCAA	NM_001191642.1
<i>Caspase 1</i>	F: ACAAAGAAGGTGGCGCATTT R: GTGCTGCAGATAATGAGGGC	NM_012762.2

<i>Gasdermina D</i>	F: AAGATCGTGGATCATGCCGT F: AAGATCGTGGATCATGCCGT	NM_001130553.1
<i>Vegf</i>	F: GCCCAGACGGGGTGGAGAGT R: AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA	NM_001110336.1
<i>Plgf</i>	F: CCGGCCCTGGCTGCATTGAA R: CAGGCAAAGCCCACAGGCGA	NM_053595.2
<i>Igf 1</i>	F: ACCCGGGACGTACCAAAATG R: CGAGCTGGTAAAGGTGAGCA	NM_178866.4
<i>Igf 2</i>	F: CATCATGTCCCACACTAAGG R: GTGCCAATTGGGTTGTTTAG	XM_008760074.2
<i>Glut1 (Slc2a1)</i>	F: CAATCAAACATGGAACCACCG R: CGATTGATGAGCAGGAAGCG	NM_138827.1
<i>Polr2a</i>	F: GCTGGACCTACTGGCATGTT R: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	XM_001079162.5

4.2.11 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com fatorial 2x2 (Experimento 1) e 4x1 (Experimento 2) e os valores médios dos grupos foram determinados pela realização de teste t Student para análise entre dois grupos ou ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls (SNK) para análise entre mais de dois grupos. Os dados passaram pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) dos erros e, para aqueles que não atendiam aos pressupostos (peso fetal), mesmo após transformação logarítmica, foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney para análise entre dois grupos ou Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn's para análise entre mais de dois grupos. Os dados paramétricos foram representados por Média \pm Erro padrão da média (SEM), enquanto os não paramétricos foram representados por mediana e limite mínimo e máximo. Para as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.2 e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Hipotireoidismo materno compromete o desenvolvimento feto-placentário.

Considerando que a alteração na expressão placentária de kisspeptina está associada a disfunções gestacionais como aborto espontâneo recorrente, diabetes e pré-eclâmpsia (ARMSTRONG et al., 2009; CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; COLAK et al., 2020; KAPUSTIN et al., 2020; MATJILA et al., 2016), o primeiro experimento teve por objetivo avaliar a expressão de kisspeptina e seu receptor Kiss1R na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas. Primeiramente, para comprovar que o hipotireoidismo compromete o desenvolvimento feto-placentário, foram realizadas análises de peso fetal e uteroplacentário aos 14 e 18 DG em ratas com hipotireoidismo. A indução do hipotireoidismo pela administração de PTU foi confirmada pela redução significativa dos níveis de T3 e T4 livre aos 0 DG nos animais hipotireoideos em relação ao grupo controle (Figura 1A). O hipotireoidismo reduziu tanto o peso uteroplacentário (Figura 1B) quanto fetal (Figura 1C) aos 14 e 18 DG, quando comparado ao grupo controle. O hipotireoidismo também afetou a distribuição da frequência relativa do peso fetal, uma vez que induziu um deslocamento para a esquerda da curva de distribuição de peso dos fetos; 64.7% dos fetos das ratas com hipotireoidismo tinham pesos menores que 0,16 g aos 14 DG, enquanto 81.4% dos fetos controle apresentavam peso entre 0,16 – 0,20 g (Figura 1D). No 18º DG, 56.4% dos fetos do grupo hipotireoideo tinham peso menor que 1,14 g, enquanto 67.7% e 32.3 % dos fetos do grupo controle apresentavam peso entre 1,14 – 1,5 g e acima de 1,7 g, respectivamente (Figura 1E). Com isso, pôde-se comprovar que o modelo experimental de hipotireoidismo utilizado neste estudo comprometeu o desenvolvimento placentário e resultou em restrição de crescimento fetal.

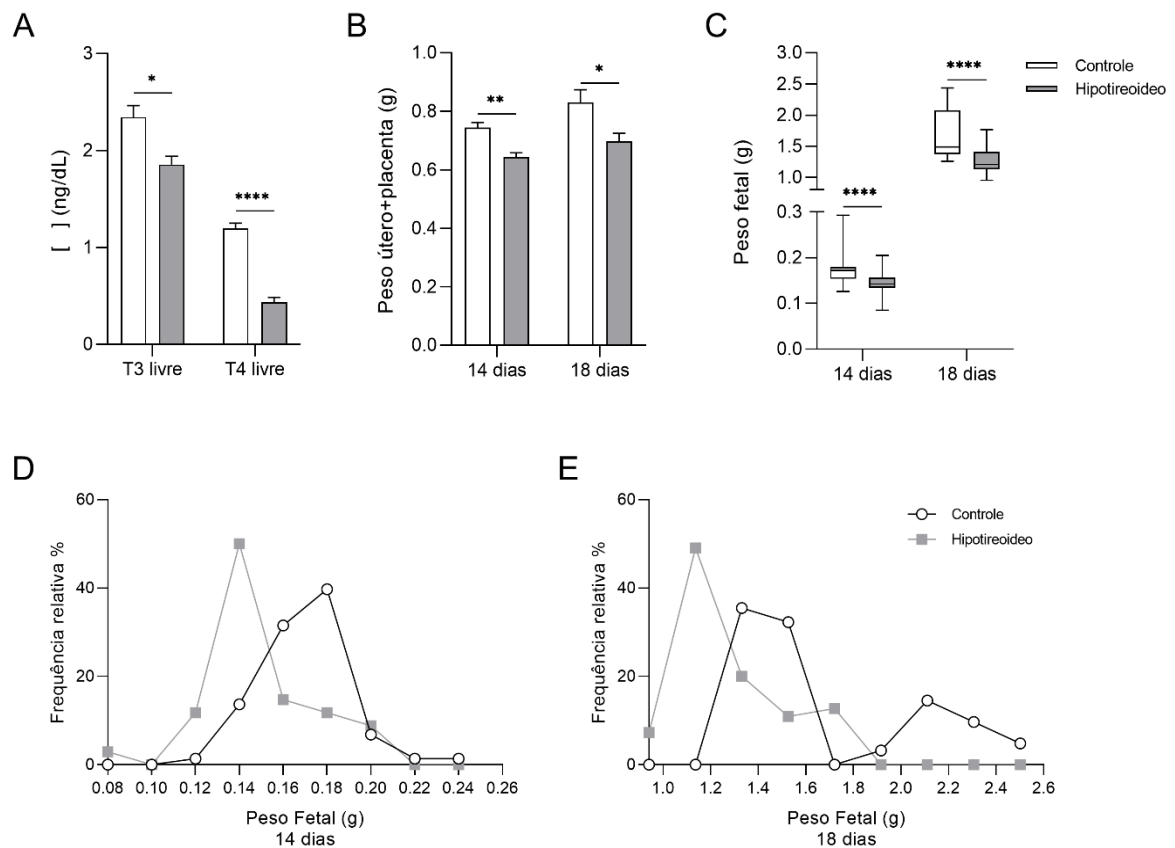


Figura 1. Confirmação do hipotireoidismo e avaliação do peso fetal e placentário das ratas controles e hipotireóideas. A) Níveis de T3 e T4 livres (ng/dL) no dia 0 DG (média±SEM; n = 5-6). B) Peso uteroplacentário nos dias 14 e 18 DG (média±SEM; n = 5-6). C) Peso fetal nos dias 14 e 18 DG (Mediana, mínimo a máximo; N = 34-73). D-E) Curvas de distribuição da frequência relativa do peso fetal nos dias 14 (D) e 18 DG (E). Diferenças significativas foram determinadas por teste t Student não pareado, exceto peso fetal que foram determinadas por teste de Mann-Whitney, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001.

4.3.2 Hipotireoidismo materno compromete a expressão placentária e decidual do sistema kisspeptina/Kiss1R em ratas.

Uma vez que foi confirmada a disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo materno, avaliamos a expressão gênica e proteica de Kiss1 e Kiss1R na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas aos 14 e 18 DG. Aos 14 DG, tanto no grupo hipotireoideo quanto controle, a expressão de kisspeptina e seu receptor foi citoplasmática, granular e heterogênea no triângulo Metrial e decídua basal do compartimento materno, como também na camada de células gigantes e espongiotrofoblasto da placenta (Figura 2A e 2E). A imunomarcagem de kisspeptina e Kiss1R foi também observada em células endoteliais e leucócitos presentes na decídua, enquanto marcação fraca ou nula foi observada em trofoblastos do labirinto placentário. No 18º DG, em contrapartida, a imunomarcagem de Kiss1 e Kiss1r foi nula em toda a interface materno-fetal para os grupos controle e hipotireoideo (Figura Suplementar 1A-P, Apêndice V). Por esse resultado, a análise da área de imunomarcagem foi realizada somente aos 14 DG.

Em relação à imunomarcagem de Kiss1, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais em nenhuma das regiões avaliadas (triângulo Metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto) (Figura 2B; $P > 0,05$). No entanto, na avaliação da expressão dos transcritos gênicos, o hipotireoidismo reduziu a expressão de mRNA de *Kiss1* na decídua aos 14 DG (Figura 2C; $P < 0,05$) e na placenta aos 18 DG (Figura 2D; $P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Em relação a Kiss1R, o hipotireoidismo reduziu a área de imunomarcagem nas regiões do triângulo Metrial e na camada de células gigantes, em relação ao controle (Figura 2F; $P < 0,05$), como também foi observado na expressão de mRNA para *Kiss1r* na decídua e na placenta aos 14 DG (Figuras 2G e 2H, $P < 0,05$), nas quais teve redução nos animais hipotireoideos quando comparado ao grupo controle. Aos 18 DG, a expressão gênica placentária de *Kiss1r* não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e hipotireoideo, enquanto não houve amplificação de transcritos gênicos para *Kiss1r* na decídua (Figuras 2G e 2H).

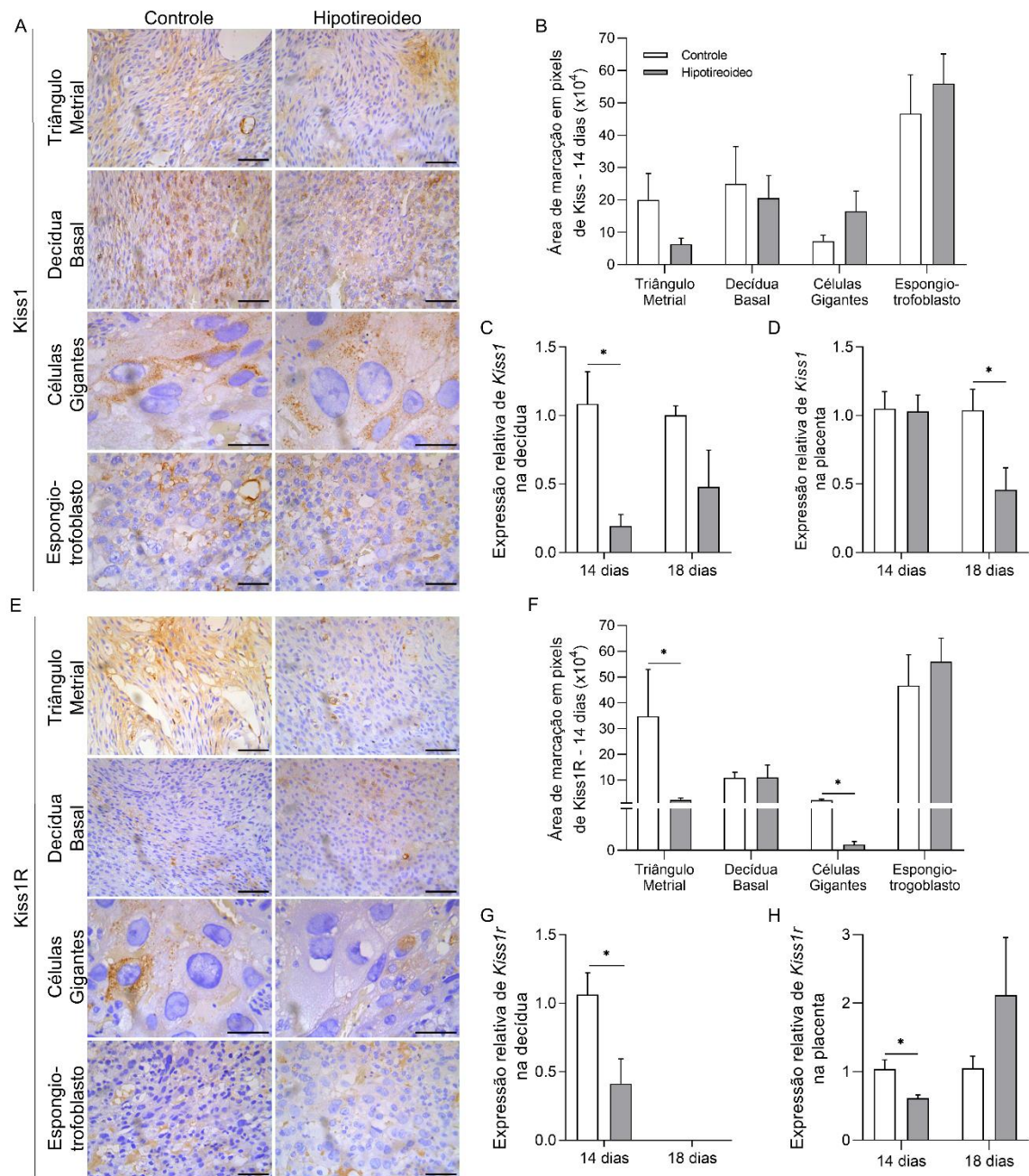


Figura 2. Expressão gênica e proteica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na interface materno-fetal das ratas controles e hipotireoideas. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Kiss1 no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de Kiss1 no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (média \pm SEM; n = 6). C-D) Expressão gênica relativa de Kiss1 na decidua (C) e placenta (D) aos 14 e 18 DG (média \pm SEM; n = 6-7). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de Kiss1R no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de Kiss1R no triângulo metrial, decídua basal, camada de células gigantes e espongiotrofoblasto aos 14 DG (média \pm SEM; n = 6). G-H) Expressão gênica relativa de Kiss1r na decidua (G) e placenta (H) aos 14 e 18 DG (média \pm SEM; n = 6-7). Diferenças significativas foram determinadas por teste t Student não pareado, *p < 0.05.

4.3.3 Tratamento diário com kisspeptina-10 melhora o desenvolvimento fetal de ratas hipotireoideas.

Pelo fato da disfunção feto-placentária nos animais hipotireoideos estar associada à redução da expressão gênica e/ou proteica de Kiss1 e Kiss1R na interface materno-fetal, o segundo experimento teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico de kisspeptina-10 (Kp10) na disfunção gestacional de ratas com hipotireoidismo materno. Para isso, os animais hipotireoideos foram tratados dia sim/dia não (KpT1) ou diariamente (KpT2) com Kp10 a partir do 8º DG para avaliação do desenvolvimento feto-placentário no 18º DG.

Na avaliação dos parâmetros maternos e placentários, foi observado que o tratamento diário com Kp10 (KpT2) aumentou o ganho de peso materno durante a gestação quando comparado aos grupos hipotireoideo e KpT1 (Figura 3B; $P < 0,05$), que tiveram menor ganho de peso gestacional em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos hipotireoideo e KpT1 para ganho de peso materno ($P > 0,05$). Além disso, os tratamentos KpT1 e KpT2 não aumentaram o peso uteroplacentário e nem do líquido amniótico dos animais hipotireoideos ($P > 0,05$), que apresentaram redução significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 3C e 3D).

Na avaliação dos parâmetros fetais, além de não ter sido observada diferença significativa no número de fetos viáveis entre os grupos experimentais (Figura 3E), os tratamentos KpT1 e KpT2 não apresentaram diferença na porcentagem de morte fetal em relação ao grupo hipotireoideo ($P > 0,05$), que apresentou maior porcentagem de morte fetal quando comparado ao grupo controle (Figura 3F; $P < 0,05$). No entanto, em relação ao peso fetal, o tratamento diário com Kp10 (KpT2) apresentou aumento significativo em relação aos grupos hipotireoideo e KpT1 (Figura G; $P < 0,0001$), que tiveram redução significativa quando comparado ao controle ($P < 0,0001$). Contudo, o aumento no peso fetal do grupo tratado com KpT2 não foi suficiente para se igualar aos valores do grupo controle ($P < 0,05$). Em relação à frequência relativa dos pesos fetais, tanto o grupo KpT2 (76.3%) quanto controle (63,8%) apresentaram maior distribuição entre 1,3 – 1,7 g, enquanto a maioria dos fetos dos grupos hipotireoideo (61.9%) e KpT1 (65.7%) tiveram pesos menores que 1,3 g, com um deslocamento a esquerda da curva de distribuição (Figura 3H).

Em relação aos órgãos fetais, observou-se que o tratamento com KpT2 restaurou o peso do fígado como também a relação cérebro/fígado dos fetos dos animais hipotireoideos, se igualando ao grupo controle (Figura 3J e 3K; $P > 0,05$), enquanto os fetos dos animais hipotireoideos e KpT1 apresentaram redução do peso do fígado e aumento da relação cérebro/fígado quando comparado ao controle ($P < 0,05$). No entanto, o tratamento com KpT2 não restabeleceu o menor peso cardíaco e pulmonar apresentado pelos fetos dos animais hipotireoideos ($P > 0,05$), que tiveram redução do peso quando comparado ao controle (Figura 3J; $P < 0,001$). Além disso, os fetos do grupo KpT1 apresentaram menor peso de fígado, coração e pulmão não somente em relação ao controle, como também em relação ao grupo hipotireoideo, demonstrando que o tratamento com KpT1 reduziu mais ainda o peso desses órgãos na condição de hipotireoidismo. O tratamento com KpT1 não teve diferença significativa na relação cérebro/fígado em relação ao grupo hipotireoideo (Figura 3K; $P > 0,05$), enquanto apresentou aumento da relação quando comparado ao controle ($P < 0,01$). Em relação ao peso dos rins, os fetos do grupo KpT1 também apresentaram redução em relação aos grupos controle ($P < 0,01$), hipotireoideo ($P < 0,0001$) e KpT2 ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa para o peso do cérebro fetal entre os grupos experimentais ($P > 0,05$). Esses dados em conjunto demonstram que o tratamento diário com Kp10 (KpT2) foi capaz de reverter parcialmente a restrição de crescimento fetal apresentado pelas ratas hipotireoideas, uma vez que restaurou a relação cérebro/fígado, um indicador de restrição de crescimento intrauterino assimétrico, como também aumentou o peso fetal.

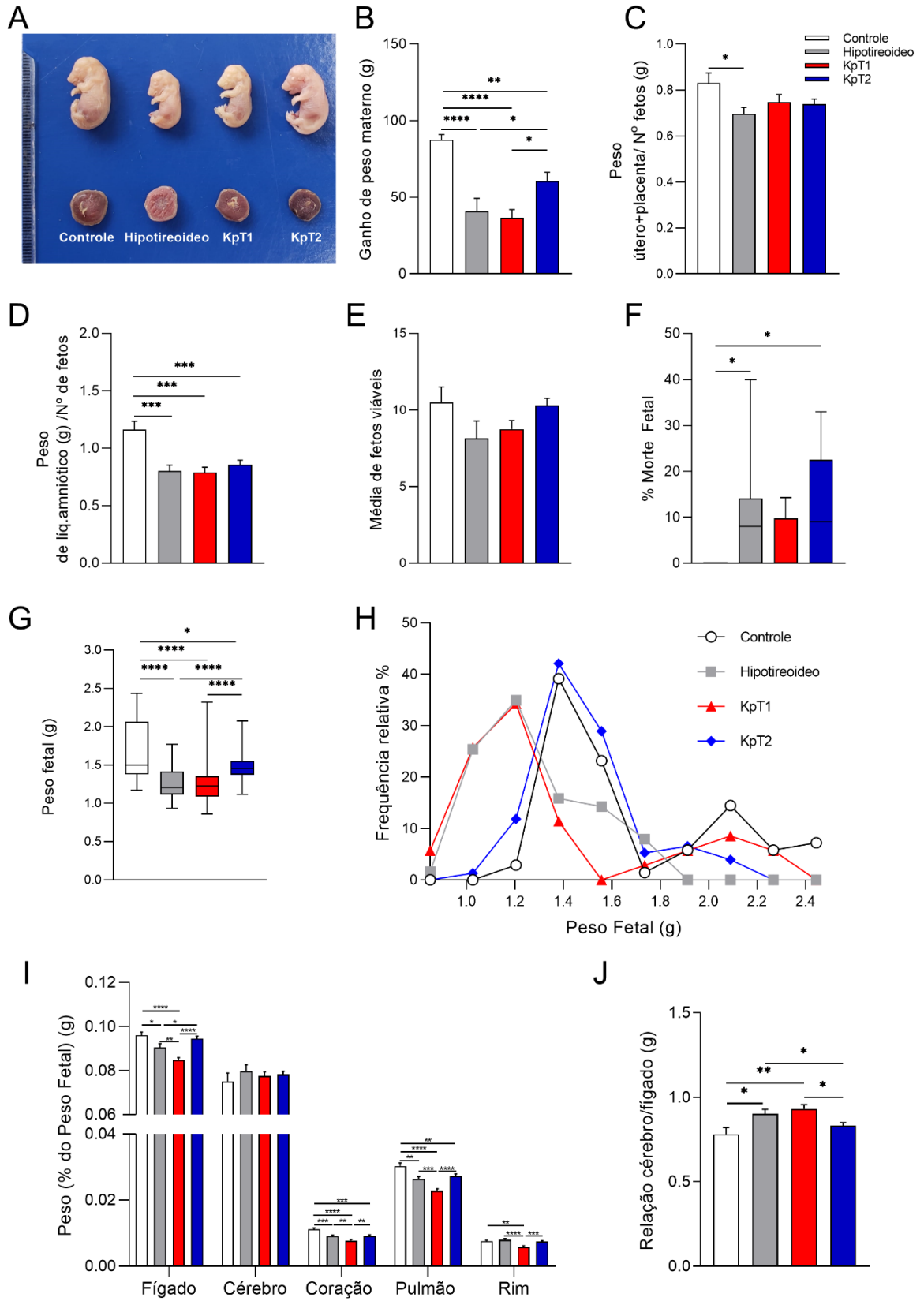


Figura 3. Parâmetros maternos e fetais das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT1 e KpT2) no 18º DG. A) Imagem representativa de fetos e placentas de cada grupo experimental. B) Ganho de peso materno durante a gestação (média±SEM; n = 8). C-D) Peso uteroplacentário (C) e do líquido amniótico (D) (média±SEM; n = 8). E) Número de fetos viáveis/ninhada (média±SEM; n = 8). F) Porcentagem de morte fetal (mediana, mínimo a máximo; n = 8). G) Curva de distribuição da frequência relativa do peso fetal. H) Peso fetal (mediana, mínimo a máximo; n = 63 -76). I) Peso dos órgãos fetais (fígado, cérebro, coração, pulmão, rim) (média±SEM; n = 15-30). J) Relação cérebro/fígado (média±SEM; n = 15-30). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, exceto para peso fetal e morte fetal que foram determinadas por teste de Kruskal-Wallis post hoc Dunn's, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. KpT1= tratamento dia sim/não com Kp10; KpT2= tratamento diário com Kp10.

4.3.4 Tratamento diário com kisspeptina-10 melhora o desenvolvimento placentário de ratas hipotireoideas.

Após observar que o tratamento diário com Kp10 melhorou o desenvolvimento fetal, foi avaliado se esse efeito poderia ser resultante de uma melhora na morfologia placentária (Figuras 4A-D). Em relação a espessura da zona juncional, não foi observada diferença entre os grupos experimentais, enquanto os grupos hipotireoideo e KpT1 apresentaram redução da espessura do labirinto placentário quando comparado ao grupo controle (Figura 4E; P < 0,05). Na avaliação da celularidade da zona juncional, foi observado que a placenta dos animais hipotireoideos apresentou maior porcentagem de área ocupada por células de glicogênio e menor de espongiotrofoblastos quando comparada à do grupo controle (P < 0,05), sendo que os tratamentos com KpT1 e KpT2 foram capazes de restabelecer a população de células de glicogênio e/ou espongiotrofoblastos na placenta dos animais hipotireoideos, igualando-a à dos animais controle (Figura 4F; P > 0,05). Em relação às células gigantes presentes na zona juncional, foi observada redução significativa nos grupos Kp1 e Kp2 em relação ao controle, enquanto a redução foi também observada no grupo KpT1 em relação ao grupo hipotireoideo (Figura 4F).

Na avaliação do labirinto placentário, que foi dividido em região superior e inferior devido às diferenças morfológicas na proporção de células e espaços sanguíneos, observou-se na região superior que o tratamento com KpT1 aumentou a porcentagem de área ocupada por capilares fetais quando comparada ao grupo hipotireoideo (P < 0,05), enquanto que não foi observada diferença significativa nas demais estruturas avaliadas (seio vascular materno e mesênquima fetal/células trofoblásticas) (Figura 4G; P > 0,05). Em contrapartida, na região inferior do labirinto, ambos os tratamentos com Kp10 aumentaram significativamente a porcentagem de

área ocupada pelo seio vascular materno em relação aos grupos controle e hipotireoideo ($P < 0,05$), enquanto houve redução da área ocupada por mesênquima fetal/células trofoblásticas quando comparado aos animais hipotireoideos ($P < 0,05$). Além disso, enquanto o hipotireoidismo reduziu a área ocupada pelos capilares fetais na região inferior do labirinto, quando comparado ao controle ($P < 0,05$), os tratamentos com KpT1 e KpT2 aumentaram a área ocupada pelos capilares fetais, igualanda à do grupo controle (Figura 4H; $P > 0,05$).

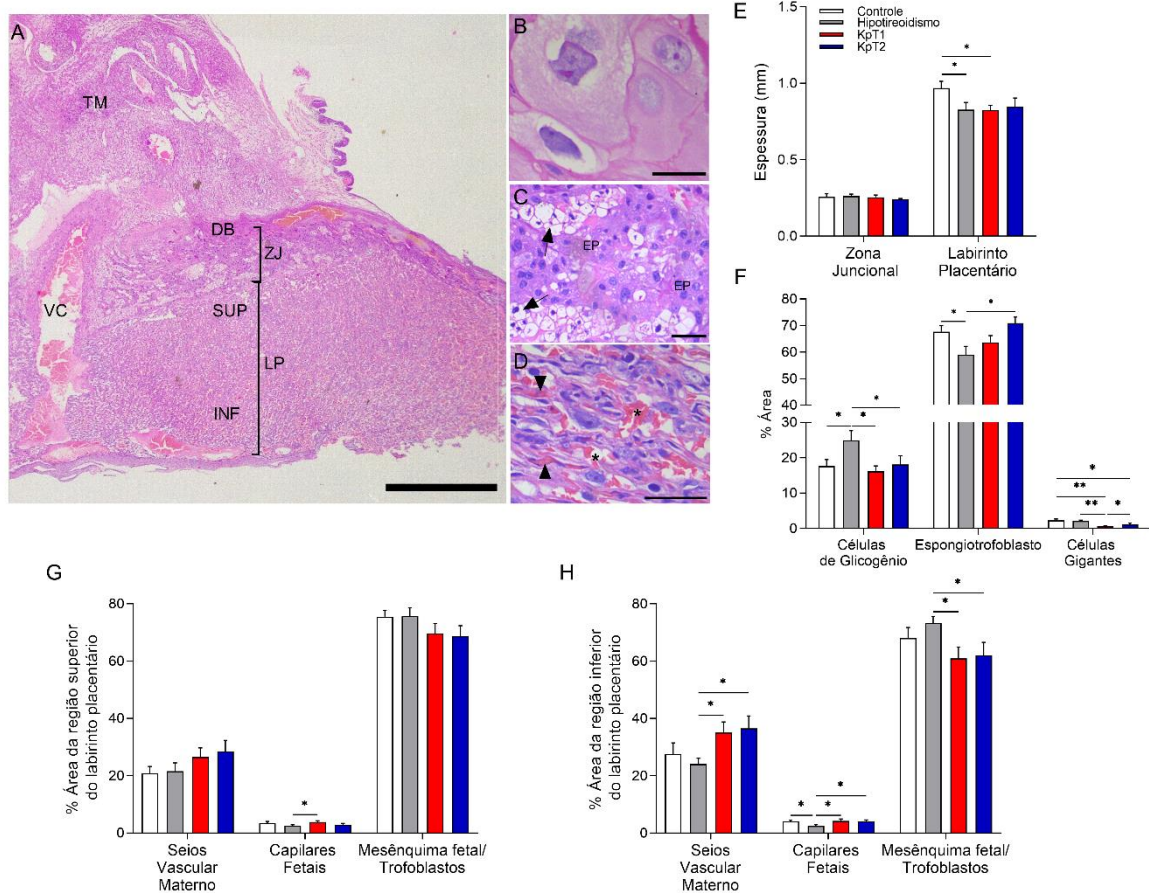


Figura 4. Avaliação histomorfométrica da placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT1 e KpT2) no 18º DG. A-D) Fotomicrografias ilustrativas da interface materno-fetal (A) e das camadas da placenta (B, células gigantes; C, espongiotrofoblasto; D, labirinto placentário) (Coloração de Hematoxilina e eosina; Bar= 500µm (A); 50µm (B-D)). E) Espessura da zona juncional (células gigantes+espongiotrofoblasto) e labirinto placentário (média±SEM; n = 8). F) Porcentagem de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes no espongiotrofoblasto (média±SEM; n = 8). G-H) Porcentagem de área ocupada por seio vascular materno, capilares fetais e mesênquima fetal/trofoblasto nas regiões superior (G) e inferior (H) do labirinto placentário (média±SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01. TM = Triângulo Metrial; DB= Decídua Basal; ZJ= Zona Juncional; LP= Labirinto Placentário; VC= Vaso central; EP= espongiotrofoblasto; SUP= Região Superior do Labirinto Placentário; INF= Região Inferior do Labirinto Placentário; Seta= células de glicogênio; Cabeça de seta= Capilares fetais; asteriscos = Seio vascular materno; KpT1= tratamento dia sim/não com Kp-10; KpT2= tratamento diário com Kp-10.

4.3.5 Tratamento com kisspeptina-10 aumenta a expressão gênica placentária de fatores de crescimento (*Plgf*, *Igf1*) e de transporte (*Glut1*) em ratas com hipotireoidismo.

Considerando que nas avaliações macroscópicas do desenvolvimento feto-placentário e histológicas da placenta o tratamento diário com Kp10 (KpT2) apresentou melhor efeito sobre o desenvolvimento fetal-placentário de ratas hipotireoideas, particularmente pela melhora no peso fetal, na relação cérebro/fígado e celularidade da zona juncional, foi avaliada a expressão placentária de fatores de crescimento (VEGF, PLGF, IGF1, IGF2) e transportadores (GLUT1) nesse grupo em relação aos grupos controle e hipotireoideo, uma vez que a alteração na expressão desses fatores está associada às alterações do crescimento feto-placentário (BALACHANDIRAN et al., 2021; FOWDEN et al., 2008; VRACHNIS et al., 2013).

A imunomarcação para VEGF foi citoplasmática e heterogênea nos trofoblastos da zona juncional e no labirinto placentário, independente do grupo experimental. No entanto, a análise da área de marcação demonstrou que os grupos hipotireoideo e KpT2 apresentaram maior expressão de VEGF na zona juncional quando comparados ao grupo controle (Figura 5A-C e 5G), como também foi observado na expressão placentária de transcritos gênicos para *Vegf*, que teve maior expressão nos grupos hipotireoideo e KpT2, em relação ao controle (Figura 5H; P< 0,05). No labirinto placentário, por outro lado, o tratamento com KpT2 reduziu a imunomarcação de VEGF em relação ao grupo hipotireoideo (P< 0,001), igualando-a à do grupo controle (Figura 5D-F e 5G; P>0,05). Em relação aos outros fatores de crescimento e de transporte placentário estudados, o tratamento diário com Kp10 aumentou

significativamente a expressão de mRNA para *Plgf*, *Igf1* e *Glut1* na placenta quando comparada aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 5H; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Para *Igf2* não foi observada diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

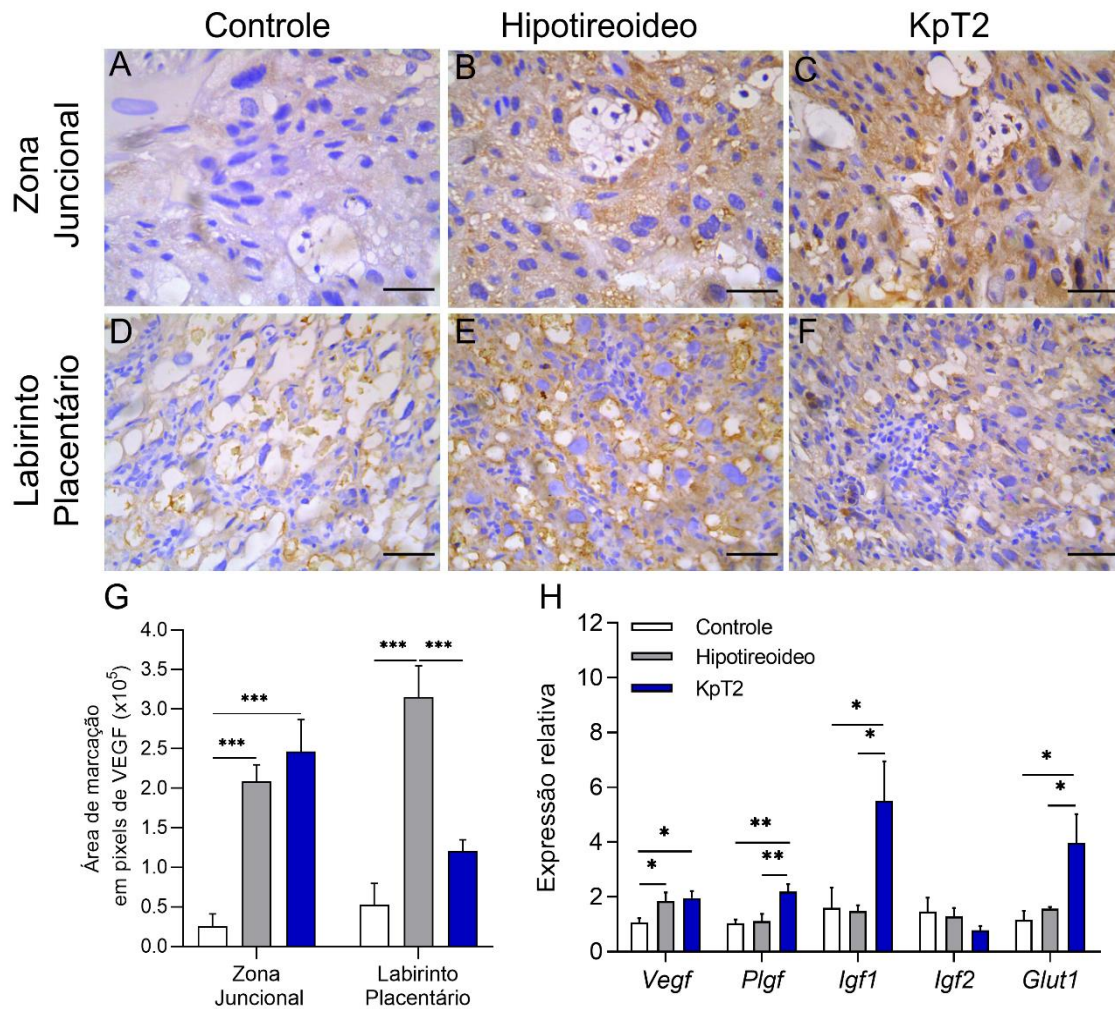


Figura 5. Expressão gênica e/ou proteica de fatores de crescimento (VEGF, PlGF, IGF1, IGF2) e transportador (GLUT1) na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18º DG. A-F) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de VEGF na zona juncional (A-C) e labirinto placentário (D-F) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). G) Área de imunomarcção em pixels da expressão de VEGF na zona juncional e labirinto placentário aos 14 DG (média \pm SEM; n = 8). H) Expressão gênica relativa de *Vegf*, *Plgf*, *Igf1*, *Igf2* e *Glut1* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. KpT2= tratamento diário com Kp10.

4.3.6 Tratamento com kisspeptina-10 altera a expressão placentária de IL10 e TNF α em ratas com hipotireoidismo.

Considerando que o desenvolvimento feto-placentário é influenciado pelos mediadores imunológicos produzidos pela placenta e que estudos anteriores demonstraram que o hipotireoidismo materno afeta a expressão placentária desses mediadores (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014), foi avaliado o efeito do tratamento diário com Kp-10 na expressão placentária de TNF α , IL-10 e IL-6 em ratas hipotireoideas. A imunomarcação de TNF α e IL-10 foi citoplasmática nas células trofoblásticas da zona juncional e labirinto placentário, sendo heterogênea para TNF α e homogênea para IL-10 (Figuras 6A e 6C). A imunomarcação para TNF α foi mais intensa na zona juncional do grupo Kp10 quando comparada à dos grupos controle e hipotireoideo (Figura 6A), como confirmado pela análise da área de imunomarcação (Figura 6B; $P < 0,05$). No labirinto placentário, as ratas hipotireoideas apresentaram maior expressão de TNF α em relação ao controle ($P < 0,05$), enquanto o tratamento com Kp10 foi semelhante ao grupo hipotireoideo ($P > 0,05$) e apresentou tendência de aumento em relação ao controle ($P = 0,06$). Não foram observadas diferenças significativas na expressão de mRNA para *Tnf* entre os grupos (Figura 6E; $P > 0,05$).

Em relação à IL-10, tanto o grupo hipotireoideo quanto o tratado com Kp10 apresentaram maior imunomarcação na zona juncional em relação ao controle (Figura 6C), como confirmado pela análise da área de imunomarcação (Figura 6D; $P < 0,05$; $P < 0,01$). No entanto, no labirinto placentário, enquanto o hipotireoidismo também aumentou a área de marcação de IL-10 quando comparado ao controle ($P < 0,05$), o tratamento com Kp10 reduziu a imunomarcação de IL-10, igualando-a à do grupo controle (Figura 6D; $P > 0,05$). Semelhante ao observado na imuno-histoquímica, o hipotireoidismo aumentou a expressão de mRNA para *Il10* comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), enquanto o tratamento diário com Kp10 não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle e hipotireoideo (Figura 6E; $P > 0,05$). Em relação à expressão de mRNA para *Il6*, não houve diferença entre os grupos (Figura 6E).

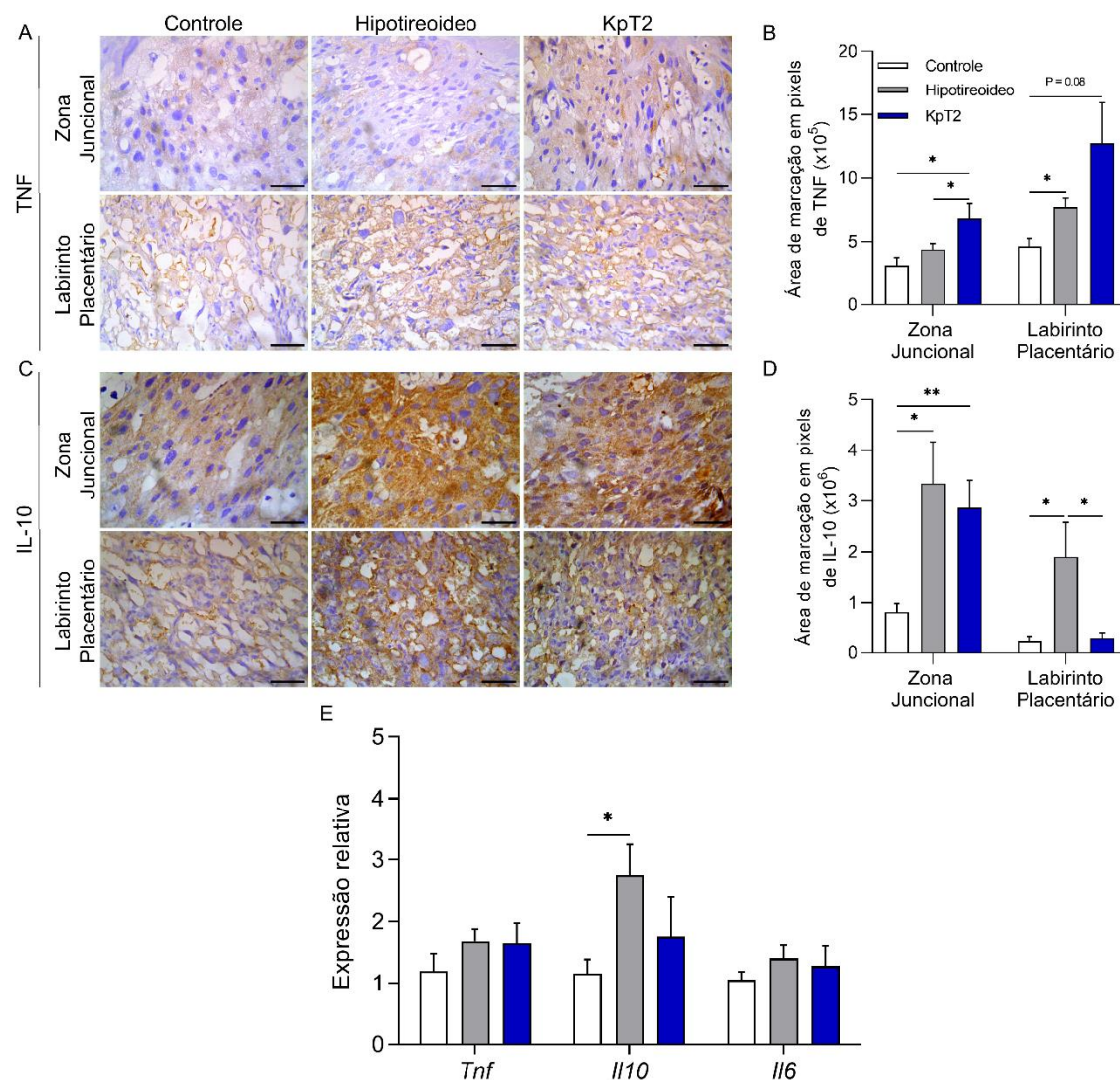


Figura 6. Expressão gênica e/ou proteica de mediadores imunológicos (TNF α , IL-10 e IL-6) na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18 $^{\circ}$ DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de TNF α na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de TNF α na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de IL-10 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de IL-10 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). E) Expressão gênica relativa de *Tnf*, *Il10* e *Il6* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA *post hoc* SNK, * p < 0.05, ** p < 0.01, * p < 0.001. KpT2= tratamento diário com Kp10.**

4.3.7 Tratamento com kisspeptina-10 aumenta a expressão placentária de enzimas antioxidantes em ratas hipotireoideas.

Uma vez que o estresse oxidativo está associado à disfunção placentária (BURTON et al., 2009; YUNG et al., 2012, 2014) e que estudo recente do nosso grupo demonstrou que o hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo na placenta de

ratas ao final da gestação (SANTOS et al., 2021), foi avaliado se o tratamento diário com Kp10 seria capaz de reverter ou reduzir o estresse celular causado pelo hipotireoidismo. Para isso, analisamos o perfil de expressão gênica e proteica das enzimas antioxidantes SOD1, catalase e GPx1/2 e do HIF1 α , um indicador de hipóxia e estresse celular.

A imunomarcção de SOD1, catalase, GPx1/2 e HIF1 α foi citoplasmática e heterogênea nas células trofoblásticas da zona juncional e no labirinto placentário, independente do grupo experimental, sendo a expressão de catalase e HIF1 α mais fraca na zona juncional quando comparada à expressão de SOD1 e GPx1/2 (Figuras 7A, 7C, 7E e 7G). O tratamento com Kp10 aumentou significativamente a expressão de SOD1 e catalase na zona juncional quando comparado aos grupos controle e hipotireoideo (Figuras 7A-7D; $P < 0,01$, $P < 0,0001$). No labirinto placentário, enquanto o grupo KpT2 apresentou redução da imunomarcção de SOD1 comparado ao controle ($P < 0,05$), o tratamento com Kp10 aumentou a expressão de catalase quando comparado ao grupo hipotireoideo (Figuras 7B e 7D; $P < 0,05$). Em relação a imunomarcção de GPx1/2, não foi observada diferença significativa entre os grupos tanto na zona juncional quanto no labirinto placentário (Figura 7F; $P > 0,05$). No entanto, na análise da expressão de transcritos gênicos, não somente *Gpx1* como também *Sod1* e *Cat* apresentaram maior expressão de mRNA no grupo tratado com Kp10 quando comparado aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 7I).

Na análise da imunomarcção para HIF1 α , tanto o grupo hipotireoideo quanto o tratado com Kp10 apresentaram maior área de imunomarcção na zona juncional quando comparado ao grupo controle (Figuras 7G e 7H; $P < 0,05$; $P < 0,01$). No labirinto placentário, em contrapartida, não foi observada diferença na imunomarcção entre os grupos ($P > 0,05$). No entanto, na avaliação gênica, semelhante ao observado na imunomarcção da zona juncional, os grupos hipotireoideo e tratado com Kp10 apresentaram maior expressão placentária de mRNA de *Hif1 α* comparado ao controle (Figura 7H; $P < 0,05$). Em conjunto, esses dados demonstram que o tratamento com Kp-10 não reverte o aumento da expressão gênica e proteica de HIF1 α causado pelo hipotireoidismo, mas foi capaz de aumentar a expressão placentária de enzimas antioxidantes.

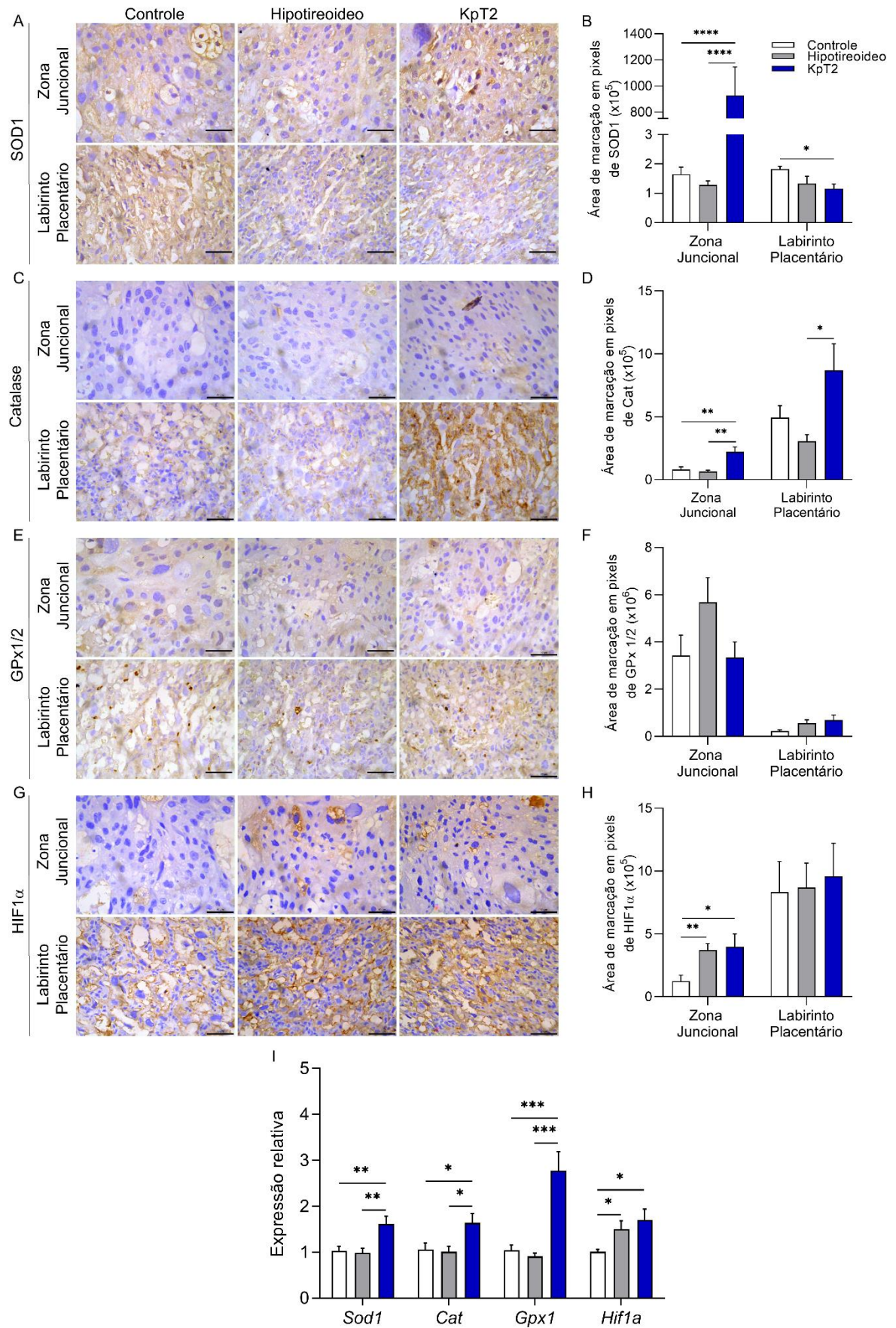


Figura 7. Expressão gênica e/ou proteica de enzimas antioxidantes (SOD1, catalase e GPx1/2) e HIF1 α na placenta das ratas controles, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18^o DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de SOD1 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de SOD1 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de catalase na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de catalase na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de GPx1/2 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de GPx1/2 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). G) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). H) Área de imunomarcção em pixels da expressão de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). I) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *catalase*, *Gpx1* e *Hif1 α* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. KpT2= tratamento diário com Kp10.

4.3.8 Tratamento com kisspeptina-10 afeta a expressão de mediadores de estresse reticular na placenta de ratas hipotireoideas.

Considerando que o estresse oxidativo está associado com a ocorrência de estresse de retículo endoplasmático e que demonstramos que o hipotireoidismo materno também causa estresse reticular na placenta de ratas (SANTOS et al., 2021), avaliamos se o tratamento com Kp10 afetaria a expressão gênica e/ou proteica de GRP78, CHOP e ATF4 na placenta de ratas com hipotireoidismo. A imunomarcção dos três fatores foi citoplasmática e heterogênea na zona juncional e labirinto placentário, sendo que a expressão na zona juncional era geralmente em células isoladas do espongiotrofoblasto ou em células de glicogênio (Figuras 8A, 8C e 8E). A análise da área de imunomarcção demonstrou que o hipotireoidismo apresentou maior imunomarcção de GRP78 e CHOP na zona juncional quando comparado ao controle (Figuras 8A-D; P < 0,05), enquanto o grupo KpT2 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo hipotireoideo para CHOP. No entanto, em relação a GRP78, o tratamento com Kp10 aumentou a imunomarcção na zona juncional quando comparado aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 8B; P < 0,05; P < 0,01). Em contrapartida, no labirinto placentário, o tratamento com KpT2 reduziu a área de imunomarcção tanto de GRP78 quanto CHOP em relação ao grupo hipotireoideo (Figuras 8B e 8D; P < 0,05; P < 0,01). Para ATF4 não foram observadas diferenças na área de imunomarcção entre os grupos experimentais (Figuras 8E e 8F; P > 0,05).

Na análise dos transcritos gênicos, o tratamento com Kp10 aumentou a expressão placentária de *Grp78* em relação aos grupos controle e hipotireoideo, semelhante ao observado na imunomarcagem da zona juncional, enquanto também foi observado aumento na expressão gênica de *Chop*, em relação ao grupo hipotireoideo (Figura 8G; $P < 0,05$). Em conjunto, esses resultados demonstram que o tratamento diário com Kp10 afeta diferentemente a expressão de mediadores do estresse reticular na placenta de ratas hipotireoideas, uma vez que mantém uma alta expressão na zona juncional, enquanto reduz a imunomarcagem na zona de labirinto.

4.3.9 Tratamento com kisspeptina-10 bloqueia o aumento da expressão gênica placentária de mediadores do inflamassoma em ratas com hipotireoidismo

Pelo fato de outros estudos terem demonstrado que o estresse oxidativo e o estresse reticular em placentas pré-eclâmpticas estão associados com a ativação do inflamassoma e piroptose (C.WEEL et al., 2017; CHENG et al., 2019; LI et al., 2020; YANG et al., 2020) e ainda não ter estudos sobre a ativação desses mecanismos na placenta de mulheres ou animais com hipotireoidismo, avaliamos a expressão gênica de fatores associados à ativação do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*) e piroptose (*Casp1*, *Gsdmd*) na placenta dos animais do presente estudo. O hipotireoidismo aumentou significativamente a expressão placentária de mRNA para *Nlrp3* ($P < 0,01$), *Il1 β* ($P < 0,05$) e *Il18* ($P < 0,01$) comparado ao grupo controle, enquanto o tratamento diário com Kp10 reduziu a expressão gênica de *Nlrp3* e *Il18* na placenta das ratas hipotireoideas igualando-a à do controle (Figura 9; $P > 0,05$). No entanto, o tratamento com Kp10 aumentou a expressão de mRNA de *Il1 β* ($P < 0,001$) e *Casp1* ($P < 0,05$) quando comparado aos grupos controle e hipotireoideo. Em relação a expressão gênica de *Gsdmd*, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 9; $P > 0,05$). Esses resultados sugerem que o hipotireoidismo materno ativa a via do inflamassoma na placenta de ratas, mas sem ativar a piroptose, enquanto o tratamento diário com Kp10 é capaz de atenuar a ativação placentária do inflamassoma causado pelo hipotireoidismo.

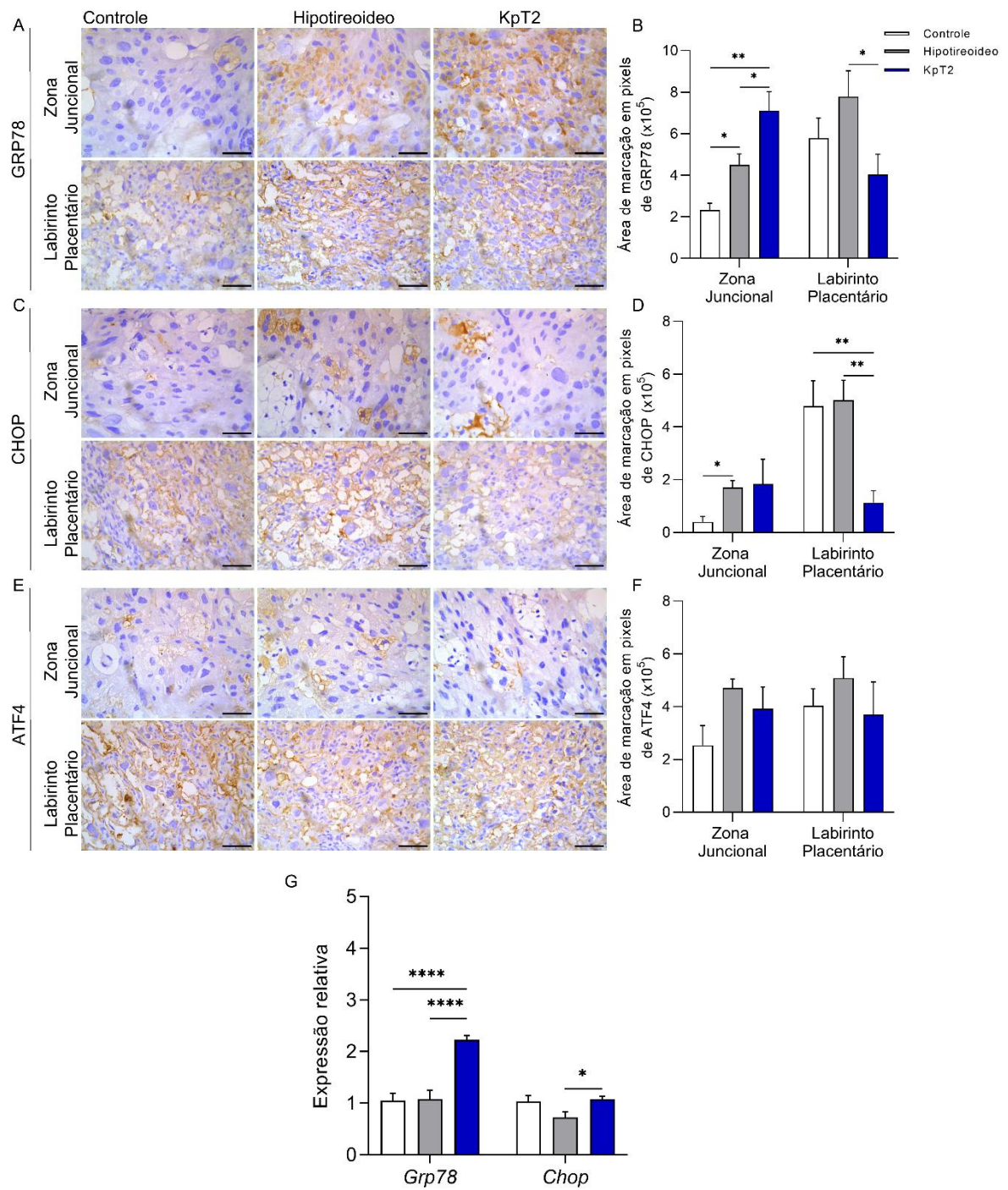


Figura 9. Expressão gênica e/ou proteica de mediadores do estresse de retículo endoplasmático (GRP78, CHOP e ATF4) na placenta das ratas controle, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18° DG. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de GRP78 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de GRP78 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de CHOP na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de CHOP na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). E) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ATF4 na zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de ATF4 na zona juncional e labirinto placentário (média \pm SEM; n = 8). G) Expressão gênica relativa de *Grp78* e *Chop* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001. KpT2= tratamento diário com Kp10.

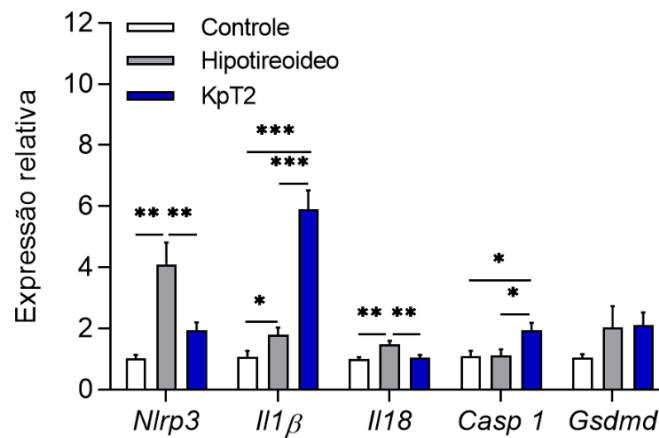


Figura 8. Expressão gênica de mediadores do inflamassoma (*Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*) e piroptose (*Casp1* e *Gsdmd*) na placenta das ratas controle, hipotireoideas e tratadas com kisspeptina-10 (KpT2) no 18° DG. Expressão gênica relativa de *Nlrp3*, *Il1 β* , *Il18*, *Casp1* e *Gsdmd* na placenta (média \pm SEM; n = 8). As diferenças significativas foram determinadas por ANOVA post hoc SNK, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. KpT2= tratamento diário com Kp10.

4.4 Discussão

Embora o sistema kisspeptina/Kiss1R seja conhecido principalmente por sua ação no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, estimulando a secreção de GnRH/LH, estudos já demonstraram que a kisspeptina possui ação periférica no trato genital (CAO et al., 2019; D'OCCHIO; CAMPANILE; BARUSELLI, 2020) e que disfunções gestacionais como pré-eclâmpsia, aborto espontâneo, diabetes gestacional e obesidade estão associadas com alterações do perfil sérico e/ou placentário de kisspeptina (ĆETKOVIĆ et al., 2012; COLAK et al., 2020; HU et al., 2019b; KAPUSTIN et al., 2020; LOGIE et al., 2012; MATJILA et al., 2016; PARK et al., 2012). Nesse sentido, os resultados do presente estudo demonstraram pela primeira vez que a disfunção feto-placentária observada em ratas com hipotireoidismo materno está associada à redução da expressão gênica e proteica de Kiss1 e Kiss1R na interface materno-fetal, e que o tratamento diário com kisspeptina-10 foi capaz de melhorar o desenvolvimento feto-placentário. Esta melhora no desenvolvimento feto-placentário foi associada não somente com o aumento da vascularização e da expressão de fatores de crescimento na placenta (PLGF, IGF1 e Glut1), como também com o aumento de enzimas antioxidantes (SOD1, catalase, GPx1) e ao bloqueio do inflamassoma, via NLRP3.

Neste estudo, o hipotireoidismo induzido pela administração de PTU, uma droga que bloqueia a tireoperoxidase (YOSHIHARA et al., 2019), confirmado pelos baixos níveis plasmáticos de T3 e T4 livres no dia 0 de gestação, resultou em restrição do crescimento fetal e placentário aos 14 e 18 dias de gestação, como já também descrito previamente (SILVA et al., 2012). A análise imuno-histoquímica demonstrou que a restrição feto-placentária decorrente do hipotireoidismo foi associada não somente à redução da expressão proteica de Kiss1R no triângulo Metrial e nas células gigantes trofoblásticas, como também à redução do mRNA de *Kiss1* e *Kiss1r* na decídua e placenta aos 14 e/ou 18 dias de gestação. Redução da expressão placentária e/ou decidual do sistema kisspeptina/Kiss1R também já foi observada em mulheres e camundongos que sofreram aborto espontâneo (LI et al., 2017; PARK et al., 2012; WU et al., 2014), sendo o aborto espontâneo uma importante complicação causada pelo hipotireoidismo materno (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). No entanto, em mulheres com pré-eclâmpsia, os estudos são ainda contraditórios, uma

vez que ZHANG et al. (2011) demonstraram aumento de mRNA de *KISS1* na placenta, enquanto CARTWRIGHT e WILLIAMS (2012) demonstraram redução da expressão gênica e proteica de Kiss1 e aumento de Kiss1R. MATJILA et al. (2016), por outro lado, não observou alteração na expressão gênica de *KISS1* e *KISS1R* na placenta, leito placentário e decídua de mulheres pré-eclâmpticas, mas evidenciou aumento da imunomarcagem placentária de KISS1, como também descrito recentemente por KAPUSTIN et al. (2020), inclusive na placenta de pacientes com diabetes gestacional. Embora essa variação observada entre os estudos possa ser resultante do período gestacional em que foi avaliada a expressão placentária e decidual de KISS1 e KISS1R, uma vez que a expressão deles varia no decorrer da gestação (HIDEN et al., 2007), esses estudos e o presente trabalho sugerem que a expressão do sistema Kiss1/Kiss1R na interface materno-fetal precisa ter um controle preciso, uma vez que a redução ou o aumento da expressão desse sistema na placenta ou na decídua estão associados a diferentes doenças gestacionais.

A avaliação da imunomarcagem de Kiss1 e Kiss1R na interface materno-fetal dos animais do presente estudo também permitiu demonstrar que ambos são expressos não somente nas células gigantes trofoblásticas, como demonstrado por TERAO et al. (2004) utilizando hibridização *in situ*, mas também no triângulo Metrial, decídua e zona juncional, que até o momento não tinha sido descrito em ratos e camundongos. Além disso, foi observada forte expressão do sistema Kiss1/Kiss1R nos leucócitos do triângulo Metrial e estudos já demonstraram que as células uNKs são a população leucocitária predominante da decídua e triângulo Metrial (AIN; CANHAM; SOARES, 2003). Sendo assim, pode-se sugerir que a redução da população de células uNKs DBA+ observada na decídua de ratas gestantes com hipotireoidismo (SOUZA et al., 2020) possa ser resultante, pelo menos em parte, da redução da expressão decidual e no triângulo Metrial de Kiss1 e Kiss1R, como observado nos animais hipotireoideos deste estudo. Essa hipótese tem como base o estudo de PARK et al. (2012) que demonstraram alta concentração de células NKs no sangue periférico de mulheres que sofreram aborto espontâneo e apresentavam maior expressão de kisspeptina na decídua.

Assim, como o hipotireoidismo reduziu a expressão decidual e placentária do sistema kisspeptina/Kiss1R em ratas e outros estudos têm sugerido a kisspeptina como um fator de predição do sucesso gestacional (HU et al., 2019b), uma vez que

restrição de crescimento fetal e baixo peso para a idade gestacional (SGA) estão associados com baixo nível plasmático de kisspeptina (ARMSTRONG et al., 2009; SMETS et al., 2008; ZIYARAA; HAMDAN; MOUSA, 2016), foi realizado o tratamento de ratas gestantes hipotireoideas com Kisspeptina-10 para avaliar seu potencial terapêutico na disfunção feto-placentária desses animais. Este foi o primeiro estudo a avaliar a kisspeptina como ferramenta terapêutica em doença gestacional, uma vez que estudos prévios apenas avaliaram seu uso em disfunção ovariana de mulheres e modelos animais experimentais (MILLAR et al., 2017; SKORUPSKAITE et al., 2020; SONIGO et al., 2012).

Assim, demonstramos que o tratamento diário com Kp10 a partir do 8º DG não somente aumentou o ganho de peso materno das ratas hipotireoideas, como melhorou o peso fetal, o que não foi observado no tratamento realizado em dias alternados. Esses resultados reafirmam a necessidade do controle preciso dos níveis plasmáticos de kisspeptina durante a gestação, uma vez que apenas o tratamento diário com Kp10 teve efeito positivo no ganho de peso materno e fetal. Além disso, é plausível que esse aumento no peso materno e fetal das ratas hipotireoideas possa estar associado com a ação da kisspeptina na função pancreática materna, uma vez que kisspeptina exógena aumenta a secreção *in vivo* e *in vitro* de insulina pelas células β pancreáticas em ratos, camundongos, humanos e primatas não-humanos (BOWE et al., 2009, 2012; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011) e que o bloqueio farmacológico ou a ablação genética *in vivo* do receptor Kiss1R nas células β de camundongos gestantes resulta em intolerância à glicose e prejuízo na secreção de insulina (BOWE et al., 2019). É importante ressaltar que durante a gestação a sensibilidade à insulina reduz 45 a 70% e que essa resistência permite a mãe utilizar ácidos graxos livres como fonte energética e liberar glicose, aminoácidos e ácidos graxos essenciais para o crescimento e desenvolvimento adequado do feto e da placenta (NEWBERN; FREEMARK, 2011). Ao mesmo tempo, a maior secreção de insulina durante a gestação é indispensável para manter a normoglicemia e evitar a hiperglicemia clínica gestacional (BOWE et al., 2019).

Em relação ao peso fetal, demonstramos que a restrição do crescimento causada pelo hipotireoidismo foi assimétrica, uma vez que a redução do peso corporal foi acompanhada da redução do peso dos órgãos fetais (fígado, coração, pulmão) e

do aumento da relação cérebro/fígado, um indicador de restrição de crescimento fetal assimétrica (SHRIVASTAVA; MASTER, 2020). O tratamento diário com Kp10 aumentou o peso do fígado e reduziu a relação cérebro/fígado dos fetos dos animais hipotireoideos, igualando-os ao dos animais controle. Isso demonstra que mesmo não retornando o peso corporal dos fetos aos valores do grupo controle, a kisspeptina foi capaz de melhorar o peso fetal e tornar o crescimento simétrico. Esse resultado em termos de desenvolvimento fetal é muito importante, uma vez que a restrição do crescimento fetal está associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida pós-natal (FOWDEN et al., 2008). Além disso, como o fígado é uma das principais fontes de kisspeptina (SONG et al., 2014) e um dos principais órgãos com função metabólica que controla o desenvolvimento fetal, por modular a liberação de insulina pancreática, por meio da sinalização de kisspeptina (BOWE et al., 2019; SONG et al., 2014; WOLFE; HUSSAIN, 2018), pode-se sugerir que o tratamento diário com Kp10 contribua para uma melhor sinalização hepato-pancreática materna e fetal e, conseqüentemente, o aumento do peso fetal. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Contudo, o desenvolvimento ótimo do feto depende não somente do metabolismo materno e fetal, como também da função placentária adequada (NEWBERN; FREEMARK, 2011). Neste ponto, observou-se que o tratamento diário com Kp10 também melhorou a morfologia placentária das ratas hipotireoideas, uma vez que restabeleceu a proporção das células trofoblásticas que formam a zona juncional, como também aumentou no labirinto placentário a área ocupada por capilares fetais, que tinha sido reduzido nas ratas hipotireoideas. Estudos prévios também demonstraram redução de capilares fetais na placenta de ratas hipotireoideas e alteração da população trofoblástica na zona juncional (SILVA et al., 2012). As células presentes na zona juncional são responsáveis principalmente pela síntese e secreção de peptídeos e hormônios pela placenta, que são fundamentais para o controle do metabolismo materno e fetal (SILVA; SERAKIDES, 2016). Embora o tratamento com Kp10 não tenha sido capaz de reverter a redução da espessura do labirinto placentário causada pelo hipotireoidismo, ele aumentou a área ocupada por seio vascular materno na região inferior do labirinto, sugerindo um maior aporte de sangue materno para a placenta. Como o labirinto é a região da placenta da rata responsável pelo fluxo de oxigênio, nutrientes e hormônios para o feto (SILVA;

SERAKIDES, 2016; SOARES et al., 2012), esse maior aporte sanguíneo também pode ter contribuído para o maior peso fetal observado nas ratas tratadas com Kp10.

Além da melhora na morfologia placentária, o tratamento diário com Kp10 também aumentou a expressão de mRNA para *Plgf*, *Igf1* e *Glut1* na placenta, fatores que são decisivos para o crescimento fetal e o desenvolvimento placentário adequados (COWANS et al., 2010; FOWDEN et al., 2008; NEWBERN; FREEMARK, 2011; SFERRUZZI-PERRI et al., 2017). O PLGF é responsável pela maturação do leito vascular placentário (TORRY et al., 1999), sendo que baixo nível plasmático de PLGF está associado com a restrição do crescimento fetal, síndrome HELLP, pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional (COWANS et al., 2010). Por esse motivo que o PLGF plasmático é considerado um importante preditor do desenvolvimento fetal (COWANS et al., 2010). Redução na expressão placentária de IGF1 também compromete o desenvolvimento fetal e placentário (SFERRUZZI-PERRI et al., 2017), enquanto GLUT1 é um importante transportador placentário de glicose e tem sua expressão reduzida quando há falha na expressão placentária de IGF1 (DESOYE; GAUSTER; WADSACK, 2011; LÜSCHER et al., 2017; SFERRUZZI-PERRI et al., 2017). Como foi demonstrado em camundongos com diabetes gestacional que a macrossomia estava associada ao aumento da sinalização de insulina/IGF1 placentária e ao aumento de GLUT1 (BALACHANDIRAN et al., 2021; BAUMANN et al., 2014; BORGES et al., 2019), é provável que no presente estudo o aumento do peso fetal, causado pelo tratamento com Kp10, possa também ser resultante do aumento da sinalização IGF1/GLUT1 placentária, uma vez que a kisspeptina estimula a liberação de insulina (BOWE et al., 2009, 2012, 2019; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011).

No entanto, em relação ao VEGF, o tratamento com Kp10 não reverteu o aumento da expressão gênica e proteica placentária causada pelo hipotireoidismo, particularmente na zona juncional. Além da sua importante função no processo de angiogênese placentária, principalmente nos terços inicial e médio da gestação (AHMED et al., 2000), o VEGF é um indicador de hipóxia já que baixos níveis de oxigênio estimulam a sua expressão (FERRARA, 2004). Nesse sentido, sua maior expressão gênica na placenta dos animais hipotireoideos e tratados com Kp10 e maior imunomarcagem na zona juncional sugerem um ambiente de baixa tensão de oxigênio na zona juncional desses animais. Essa hipótese é corroborada pela maior expressão

gênica e proteica de HIF1 α , especialmente na zona juncional, observada nos animais hipotireoideos e tratados com Kp10. O HIF1 α é expresso em condições de hipóxia e realiza suas funções na permeabilidade vascular e na sobrevivência celular ao sinalizar via VEGF (KAELIN JR.; RATCLIFFE, 2008). Além disso, estudos já demonstraram aumento da expressão de HIF1 α e VEGF em placentas pré-eclâmplicas, que reconhecidamente apresentam um ambiente de hipóxia (ALI et al., 2019; KAELIN JR.; RATCLIFFE, 2008; SEZER et al., 2013). No entanto, curiosamente, ao avaliar o labirinto placentário, o tratamento com Kp10 reduziu o aumento da imunomarcagem de VEGF causado pelo hipotireoidismo, igualando sua expressão à dos animais controle. É plausível que essa redução na expressão de VEGF seja resultante do aumento do seio vascular materno e capilar fetal no labirinto placentário causado pelo tratamento com Kp10 o que, possivelmente, aumentou o aporte de oxigênio para essa região da placenta. Esses dados reforçam a importância da análise imuno-histoquímica que permite discriminar e avaliar adequadamente o perfil de expressão proteica dos mediadores avaliados em cada região da placenta.

Em relação ao TNF α , o tratamento com Kp10 aumentou a imunomarcagem na zona juncional, enquanto no labirinto placentário tanto os animais hipotireoideos quanto os tratados com Kp10 apresentaram maior expressão quando comparados aos animais controle. Estudos *in vitro* demonstraram que o TNF α secretado por macrófagos decíduais é reconhecido por receptores TNF-R1, presentes nos trofoblastos, e ativa a via extrínseca da apoptose (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003), enquanto um estudo recente demonstrou que kisspeptina aumenta a apoptose celular (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2020). Com base nisso, é provável que o tratamento com Kp10 possa ter aumentado a ativação da apoptose placentária, via sinalização de TNF α , à medida que ratas gestantes com hipotireoidismo apresentam aumento da apoptose na placenta (SILVA et al., 2012). Entretanto, como sugerimos anteriormente que a zona juncional das ratas hipotireoideas e tratadas com Kp10 pode estar sob baixa tensão de oxigênio e este ambiente está também associado à ativação de vias inflamatórias em resposta ao estresse celular (SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017), o aumento de TNF α pode ser reflexo do estresse oxidativo observado na placenta de ratas com hipotireoidismo (SANTOS et al., 2021). No entanto, aumento de TNF α também ocorre com o aumento da resistência à insulina (BORST, 2004). Assim, outra possibilidade para explicar sua maior expressão nos animais tratados com Kp10 pode

ser o aumento da insulina que ocorre após a administração de kisspeptina (BOWE et al., 2009, 2012, 2019; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011).

Semelhante ao observado para o TNF α , a IL-10 também apresentou maior expressão na zona juncional dos animais hipotireoideos e tratados com Kp10 comparada ao controle, além da maior expressão gênica na placenta dos animais hipotireoideos. Sugerimos que esse aumento de IL-10 seja reflexo da maior expressão de TNF α , uma vez que a IL-10 tem a função de atenuar os efeitos das citocinas pró-inflamatórias na interface materno-fetal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2017; THAXTON; SHARMA, 2010) e TNF α estimula a secreção *in vitro* de IL-10 em vilos trofoblásticos de primeiro trimestre (SIWETZ et al., 2016). No entanto, o tratamento com Kp10 reduziu a maior imunomarcagem de IL-10 no labirinto placentário causado pelo hipotireoidismo, se igualando ao controle. Mais estudos são necessários para elucidar se esse efeito da Kp10 na expressão de IL-10 no labirinto placentário é reflexo da maior vascularização nessa camada placentária causada pelo tratamento com Kp10.

O tratamento diário com Kp10 também aumentou a expressão gênica e/ou proteica das enzimas antioxidantes SOD1, Catalase e GPx1 na placenta das ratas hipotireoideas, sugerindo uma função antioxidante da kisspeptina na interface materno-fetal. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios realizados em ovário (ASLAN et al., 2017), fígado (AYDIN et al., 2010) e testículo (AKKAYA et al., 2017) que também observaram aumento de enzimas antioxidantes após tratamento com kisspeptina. Além disso, como descrito anteriormente, o aumento do mRNA e da imunomarcagem de HIF1 α na zona juncional dos animais hipotireoideos e tratados com Kp10 sinaliza uma baixa tensão de oxigênio e sugere a ativação de vias de estresse oxidativo na placenta de ratas hipotireoideas, que foi recentemente confirmado pelo nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2021). A ativação de HIF1 α na placenta de ratas também favorece a redução da espessura do labirinto placentário (SOARES et al., 2014), corroborando com os resultados histomorfométricos do presente estudo. Assim, em conjunto, esses dados sugerem que na condição de estresse oxidativo placentário causado pelo hipotireoidismo, o tratamento com Kp10 melhora as defesas antioxidantes da placenta e, conseqüentemente, o desenvolvimento feto-placentário.

Sugere-se que o estresse oxidativo observado na placenta de ratas hipotireoideas seja resultante da falha da migração trofoblástica intrauterina descrita nesses animais (SANTOS et al., 2021; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014), uma vez que compromete o remodelamento vascular e, conseqüentemente, o aporte sanguíneo para a placenta (APLIN et al., 2020; FISHER, 2015). Essa falha na migração trofoblástica também é reconhecida como um dos principais mecanismos fisiopatológicos da pré-eclâmpsia, alteração gestacional que também acarreta estresse celular, restrição de crescimento fetal e inflamação (BURTON; JAUNIAUX, 2004; CINDROVA-DAVIES, 2009).

O hipotireoidismo também aumentou a imunomarcagem na zona juncional de mediadores de estresse de retículo endoplasmático, GRP78 e CHOP, outro processo fisiopatológico envolvido na disfunção placentária de mulheres pré-eclâmpicas (WALTER; RON, 2011; YUNG et al., 2008, 2016) e que foi recentemente identificado na placenta de ratas hipotireoideas (SANTOS et al.; 2021). Interessantemente, embora o tratamento com Kp10 não tenha sido capaz de reverter a expressão desses mediadores na zona juncional das ratas hipotireoideas, inclusive com aumento da expressão gênica placentária de *Grp78* e *Chop* quando comparado ao grupo hipotireoideo, o tratamento com Kp10 reduziu a imunomarcagem de GRP78 e CHOP no labirinto placentário dos animais hipotireoideos, sugerindo a atenuação do estresse reticular nessa camada placentária após o tratamento com Kp10. É plausível que este efeito, semelhante ao observado para VEGF e IL-10, também tenha sido resultante da maior vascularização no labirinto placentário causada pelo tratamento com Kp10 e que resultou no maior aporte sanguíneo e de oxigênio para essa camada da placenta.

No presente estudo, o tratamento com Kp10 foi capaz de bloquear o aumento da expressão de *Nlrp3* e *Il18*, mediadores do inflamassoma, na placenta das ratas hipotireoideas, demonstrando que o tratamento protegeu esses animais contra a ativação desse processo na placenta (GOMEZ-LOPEZ et al., 2019; LI et al., 2020; MANGAN et al., 2018). A ativação do inflamassoma tem como principal causa o estresse celular (LI et al., 2020) e já foi identificado na fisiopatologia da obesidade (VANDANMAGSAR et al., 2011), do diabetes mellitus tipo 2, da esteatose hepática não alcoólica (MANGAN et al., 2018), da pré-eclâmpsia (YANG et al., 2020), do aborto espontâneo (GAO et al., 2020) e dos distúrbios gestacionais hiperglicêmicas (CORRÊA-SILVA et al., 2018), doenças que estão associadas com alteração na

expressão placentária do sistema kisspeptina/Kiss1R. Vale ressaltar que esta é a primeira vez que a ativação da via do inflamassoma na interface materno-fetal foi demonstrada em ratas com hipotireoidismo, pelo aumento dos níveis de mRNA de *Nlrp3*, *Il1 β* e *Il18* na placenta das ratas hipotireoideas. A ativação do inflamassoma causado pelo hipotireoidismo tinha sido descrito apenas recentemente na disfunção cardíaca de ratos hipotireoideos (SAHIN et al., 2019).

No entanto, o tratamento com Kp10 aumentou a expressão gênica placentária de *Il1 β* e *Caspase 1*. Embora a expressão de IL1 β e caspase 1 estejam envolvidas na ativação do inflamassoma (JO et al., 2016), é provável que o seu aumento na placenta dos animais tratados com Kp10 esteja associado a outras vias metabólicas, uma vez que o tratamento com Kp10 bloqueou o aumento de *Nlrp3* e esta é necessária para a ativação do inflamassoma (DIXON et al., 2013; JO et al., 2016; KOTAS et al., 2013). Uma hipótese é que o aumento da expressão placentária de *Il1 β* e *caspase 1* seja resultante da maior liberação de insulina causada pela kisspeptina (BOWE et al., 2009, 2012, 2019; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011). Estudos já demonstraram que a caspase 1 tem papel no metabolismo lipídico e camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica apresentam aumento da expressão de *caspase 1* e *Il1 β* no fígado (DIXON et al., 2013; MOLLA et al., 2020). Além disso, caspase 1 induz o aumento de TNF α nessa condição metabólica (DIXON et al., 2013; MOLLA et al., 2020), corroborando com os resultados de TNF α placentário do presente estudo. O aumento de *Il1 β* placentário causado pelo tratamento com Kp10 pode ser também decorrente do aumento de *Igf1*, observado neste estudo, e de insulina, como demonstrado por outros pesquisadores (BOWE et al., 2009, 2012, 2019; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011), uma vez que já foi demonstrada ação conjunta desses fatores amplificando a expressão de IL1 β (GUAN et al., 1998). No entanto, estudos avaliando se a administração de kisspeptina favorece um estado hiperinsulinêmico em ratas gestantes hipotireoideas são ainda necessários para comprovar as nossas hipóteses.

Estudos recentes demonstraram que a ativação do inflamassoma NLRP3 em placentas pré-eclâmpicas também induz a ocorrência de piroptose (CHENG et al., 2019; TAO et al., 2020), uma morte celular programada não apoptótica que causa lise celular, liberação de citocinas e inflamação estéril (FANG et al., 2020). No entanto, o

presente estudo demonstrou que nem o hipotireoidismo e nem o tratamento com Kp10 aumentaram a expressão de mRNA de *Gasdermina d*, um indicador de piroptose, sugerindo que o hipotireoidismo e a administração de kisspeptina não causam piroptose na placenta.

4.5 Conclusão

Os resultados deste estudo permitiram demonstrar que a disfunção feto-placentária observada em ratas com hipotireoidismo materno está associada à redução da expressão do sistema kisspeptina/Kiss1R na interface materno-fetal. Além disso, o tratamento diário com Kp10 em ratas gestantes hipotireoideas foi capaz de melhorar o desenvolvimento feto-placentário. Essa melhora foi associada não somente ao aumento da vascularização placentária e de fatores de crescimento placentário e enzimas antioxidantes, como pelo bloqueio da ativação do inflamassoma causada pelo hipotireoidismo. Este é o primeiro estudo a utilizar a kisspeptina como ferramenta terapêutica em uma doença gestacional e sugere que análogos de kisspeptina podem ser úteis na resolução de problemas associados à restrição do crescimento fetal causados por disfunção placentária.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ADALI, E. et al. Metastin levels in pregnancies complicated by pre-eclampsia and their relation with disease severity. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 12, p. 2671–5, 23 dez. 2012.

AHMED, A. et al. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. **Placenta**, v. 21 Suppl A, n. SUPPL.1, p. S16-24, mar. 2000.

AIN, R.; CANHAM, L. N.; SOARES, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: Novel endocrine phenotype and regulation. **Developmental Biology**, v. 260, n. 1, p. 176–190, 1 ago. 2003.

AKKAYA, H. et al. Investigation of the effects of kisspeptin-10 in methionine-induced lipid peroxidation in testicle tissue of young rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 5, p. 1–7, 2017.

ALI, L. E. et al. Placental growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia-inducible factor-1 α in the placentas of women with pre-eclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 32, n. 16, p. 2628–2632, 18 ago. 2019.

AOUACHE, R. et al. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1496, 17 maio 2018.

APLIN, J. D. et al. Tracking placental development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 9, p. 479–494, 2020.

ARMSTRONG, R. A. et al. Decreased serum levels of kisspeptin in early pregnancy are associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 29, n. 10, p. 982–985, out. 2009.

ASLAN, M. et al. The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 4, p. 456–462, 1 ago. 2017.

AYDIN, M. et al. Direct and indirect effects of kisspeptin on liver oxidant and antioxidant systems in young male rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 4, p. 293–299, 2010.

BALACHANDIRAN, M. et al. Decreased maternal serum adiponectin and increased insulin-like growth factor-1 levels along with increased placental glucose transporter-1 expression in gestational diabetes mellitus: Possible role in fetal overgrowth: Regulation of placental GLUT-1 expr. **Placenta**, v. 104, n. September 2020, p. 71–80, jan. 2021.

BAUMANN, M. U. et al. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2014.

BELET, N. et al. Thyroid function tests in preterm infants born to preeclamptic

mothers with placental insufficiency. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 8, p. 1131–1135, 2003.

BILBAN, M. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1319–1328, 15 mar. 2004.

BORGES, M. H. et al. Human placental GLUT1 glucose transporter expression and the fetal insulin-like growth factor axis in pregnancies complicated by diabetes. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1865, n. 9, p. 2411–2419, 1 set. 2019.

BORST, S. E. The role of TNF- α in insulin resistance. **Endocrine**, v. 23, n. 2–3, p. 177–182, 2004.

BOWE, J. E. et al. Kisspeptin stimulation of insulin secretion: Mechanisms of action in mouse islets and rats. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 855–862, 2009.

BOWE, J. E. et al. GPR54 peptide agonists stimulate insulin secretion from murine, porcine and human islets. **Islets**, v. 4, n. 1, p. 20–23, 2012.

BOWE, J. E. et al. A role for placental kisspeptin in β cell adaptation to pregnancy. **JCI Insight**, v. 4, n. 20, 2019.

BURTON, G. J. et al. Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 43–48, mar. 2009.

BURTON, G. J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **BMJ**, v. 366, p. l2381, 15 jul. 2019.

BURTON, G. J.; CINDROVA-DAVIES, T.; TURCO, M. Y. Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy. **Placenta**, v. 102, n. February, p. 21–26, 2020.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 342–52, 28 set. 2004.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, jun. 2011.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, p. S6.e1-S6.e4, 1 out. 2015.

BURTON, G. J.; YUNG, H.-W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 1, n. 1, p. 72–78, jan. 2011.

C.WEEL, I. et al. Increased expression of NLRP3 inflammasome in placentas from pregnant women with severe preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 123, n. August, p. 40–47, 2017.

CALDER, M. et al. Implantation Failure in Female Kiss1^{-/-} Mice Is Independent of Their Hypogonadic State and Can Be Partially Rescued by Leukemia Inhibitory Factor. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3065–3078, 1 ago. 2014.

CAO, Y. et al. Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 17, n. 1, p. 65, 9 ago. 2019.

CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 79–85, jul. 2012.

CASTELLANO, J. M. et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852–62, 1 out. 2006.

ĆETKOVIĆ, A. et al. Plasma kisspeptin levels in pregnancies with diabetes and hypertensive disease as a potential marker of placental dysfunction and adverse perinatal outcome. **Endocrine Research**, v. 37, n. 2, p. 78–88, 10 maio 2012.

CHAKRABARTI, S. K. et al. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 674–678, 1 set. 2016.

CHAKRABORTY, D. et al. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 39, p. 16295–16300, 27 set. 2011.

CHATTOPADHYAY, S. et al. Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats: A temporal analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 383–391, set. 2007.

CHEN, C.-Y.; CHEN, C.-P.; LIN, K.-H. Biological functions of thyroid hormone in placenta. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 4161–79, 16 fev. 2015.

CHENG, S. BIN et al. Pyroptosis is a critical inflammatory pathway in the placenta from early onset preeclampsia and in human trophoblasts exposed to hypoxia and endoplasmic reticulum stressors. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 12, 2019.

CINDROVA-DAVIES, T. et al. Nuclear factor- κ B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: Effects of antioxidant vitamins. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1511–1520, maio 2007.

CINDROVA-DAVIES, T. Gabor Than Award Lecture 2008: Pre-eclampsia - From Placental Oxidative Stress to Maternal Endothelial Dysfunction. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 55–65, mar. 2009.

COLAK, E. et al. Is placental KISS-1 expression associated with first trimester abortion spontaneous? **Obstetrics and Gynecology Science**, v. 63, n. 4, p. 490–496, 2020.

CORRÊA-SILVA, S. et al. Hyperglycemia induces inflammatory mediators in the human chorionic villous. **Cytokine**, v. 111, n. August 2017, p. 41–48, nov. 2018.

COWANS, N. J. et al. First-trimester placental growth factor as a marker for hypertensive disorders and SGA. **Prenatal Diagnosis**, v. 30, n. 6, p. 565–570, jun. 2010.

D'OCCHIO, M. J.; CAMPANILE, G.; BARUSELLI, P. S. Peripheral action of kisspeptin at reproductive tissues—role in ovarian function and embryo implantation and relevance to assisted reproductive technology in livestock: a review. **Biology of Reproduction**, p. 1–14, 2020.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003.

DESOYE, G.; GAUSTER, M.; WADSACK, C. Placental transport in pregnancy pathologies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 6, p. 1896–1902, 2011.

DIXON, L. J. et al. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56100, 7 fev. 2013.

DUDEK, M. et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats. **Neuropeptides**, v. 56, p. 41–49, abr. 2016.

FANG, Y. et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, n. October 2019, p. 109595, 18 jan. 2020.

FAYAZI, M. et al. The pregnant mouse uterus exhibits a functional kisspeptin/KISS1R signaling system on the day of embryo implantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2015.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 1 ago. 2004.

FISHER, S. J. Why is placentation abnormal in preeclampsia? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, p. S115–S122, out. 2015.

FOWDEN, A. L. et al. The placenta and intrauterine programming. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 439–50, abr. 2008.

FRANCIS, V. A. et al. Kisspeptin Regulation of Genes Involved in Cell Invasion and Angiogenesis in First Trimester Human Trophoblast Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99680, 12 jun. 2014.

GAO, P. et al. The role of maternal–foetal interface inflammation mediated by NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion. **Placenta**, v. 101, n. September, p. 221–229, 2020.

GOLZAR, F.; JAVANMARD, S. H.; DANA, N. The effect of kisspeptin-10 on angiogenesis and tumor growth. **International Journal of Clinical and Experimental Physiology**, v. 1, n. 2, p. 101, 2014.

GOMEZ-LOPEZ, N. et al. Inflammasomes: Their Role in Normal and Complicated Pregnancies. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 11, p. 2757–2769, 2019.

GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. The role of kisspeptin in immune tolerance formation during pregnancy. **Doklady Biological Sciences**, v. 457, n. 1, p. 258–260, 30 jul. 2014.

GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. Role of Kisspeptin in Regulation of Reproductive and Immune Reactions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 8, p. 839–853, 2020.

GUAN, Z. et al. IGF-I and insulin amplify IL-1 β -induced nitric oxide and prostaglandin biosynthesis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 274, n. 4 43-4, p. 673–679, 1998.

GUIMOND, M. J. et al. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 169–179, 1 jan. 1997.

HARMON, Q. E. et al. Risk of fetal death with preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 125, n. 3, p. 628–635, mar. 2015.

HARTER, C. J. L.; KAVANAGH, G. S.; SMITH, J. T. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. **The Journal of endocrinology**, v. 238, n. 3, p. R173–R183, 1 set. 2018.

HEMBERGER, M.; HANNA, C. W.; DEAN, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. **Nature reviews. Genetics**, v. 21, n. 1, p. 27–43, 18 jan. 2020.

HIDEN, U. et al. Kisspeptins and the placenta: Regulation of trophoblast invasion. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 8, n. 1, p. 31–39, mar. 2007.

HORIKOSHI, Y. et al. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: Metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 914–919, 1 fev. 2003.

HU, K.-L. et al. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. **Human reproduction update**, v. 25, n. 3, p. 326–343, 1 maio 2019a.

HU, K.-L. L. et al. Kisspeptin as a potential biomarker throughout pregnancy. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v.

240, n. 1, p. 261–266, 1 set. 2019b.

HUNG, T.-H. H.; BURTON, G. J. Hypoxia and Reoxygenation: a Possible Mechanism for Placental Oxidative Stress in Preeclampsia. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 45, n. 3, p. 189–200, set. 2006.

HUPPERTZ, B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020.

IZZI-ENGBEAYA, C. et al. The effects of kisspeptin on β -cell function, serum metabolites and appetite in humans. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. 12, p. 2800–2810, 2018.

JAMES, S. R.; FRANKLYN, J. A.; KILBY, M. D. Placental transport of thyroid hormone. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 253–264, jun. 2007.

JAYASENA, C. N. et al. The identification of elevated urinary kisspeptin-immunoreactivity during pregnancy. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 52, n. 3, p. 395–398, 2015.

JEDDI, S.; ZAMAN, J.; GHASEMI, A. Effect of fetal hypothyroidism on tolerance to ischemia-reperfusion injury in aged male rats: Role of nitric oxide. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 55–56, p. 82–90, 1 maio 2016.

JO, E. K. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–159, 2016.

KAELIN JR., W. G.; RATCLIFFE, P. J. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. **Molecular Cell**, v. 30, n. 4, p. 393–402, 23 maio 2008.

KALKUNTE, S. et al. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 88, n. 2, p. 165–169, mar. 2011.

KAPUSTIN, R. V. et al. Placental protein expression of kisspeptin-1 (KISS1) and the kisspeptin-1 receptor (KISS1R) in pregnancy complicated by diabetes mellitus or preeclampsia. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 2, p. 437–445, 6 fev. 2020.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 1, p. 1–7, 1 jul. 2003.

KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 269–280, 2010.

KOŁODZIEJSKI, P. A. et al. Serum levels of spexin and kisspeptin negatively correlate with obesity and insulin resistance in women. **Physiological Research**, v. 67, n. 1, p. 45–56, 2018.

- KOTANI, M. et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 76, n. 37, p. 3479–3496, 14 set. 2019.
- KOTAS, M. E. et al. Role of caspase-1 in regulation of triglyceride metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4810–4815, 2013.
- KURLAK, L. O. et al. Thyroid hormones and their placental deiodination in normal and pre-eclamptic pregnancy. **Placenta**, v. 34, n. 5, p. 395–400, maio 2013.
- LAI, Z.; KALKUNTE, S.; SHARMA, S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 505–514, mar. 2011.
- LEE, C.-L. et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Proinflammatory Cytokine–Mediated Inhibition of Trophoblast Invasion in Placenta-Related Complications of Pregnancy. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 2, p. 467–478, 1 fev. 2019.
- LI, L. et al. Role of kisspeptin/GPR54 in the first trimester trophoblast of women with a history of recurrent spontaneous abortion. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 10, n. 8, p. 8161–8173, 2017.
- LI, W. et al. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6129–6140, 24 jul. 2020.
- LIAN, I. A. et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. **Placenta**, v. 32, n. 11, p. 823–829, nov. 2011.
- LIU, J.-L.; WANG, T.-S. Systematic Analysis of the Molecular Mechanism Underlying Decidualization Using a Text Mining Approach. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0134585, 29 jul. 2015.
- LIU, Z. et al. microRNA-520c-3p suppresses NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cascade in preeclampsia by downregulating NLRP3. **Inflammation Research**, v. 68, n. 8, p. 643–654, 2019.
- LOGIE, J. J. et al. Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-eclampsia. **Clinical endocrinology**, v. 76, n. 6, p. 887–893, jun. 2012.
- LÜSCHER, B. P. et al. Placental glucose transporter (GLUT)-1 is down-regulated in preeclampsia. **Placenta**, v. 55, p. 94–99, 2017.
- MAGUIRE, J. J. et al. Inotropic action of the puberty hormone kisspeptin in rat, mouse and human: cardiovascular distribution and characteristics of the kisspeptin receptor. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27601, 22 nov. 2011.
- MANCINI, A. et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 6757154, 2016.

- MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 8, p. 588–606, 20 ago. 2018.
- MATJILA, M. et al. Elevated placental expression at the maternal-fetal interface but diminished maternal circulatory kisspeptin in preeclamptic pregnancies. **Pregnancy Hypertension**, v. 6, n. 1, p. 79–87, 1 jan. 2016.
- MENG, L. et al. Dietary-induced chronic hypothyroidism negatively affects rat follicular development and ovulation rate and is associated with oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, p. 90, 1 abr. 2016.
- MILLAR, R. P. et al. Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Reactivation by Kisspeptin-10 in Hyperprolactinemic Women With Chronic Amenorrhea. **Journal of the Endocrine Society**, v. 1, n. 11, p. 1362–1371, 16 out. 2017.
- MOLLA, M. D. et al. Caspase-1 as a regulatory molecule of lipid metabolism. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2020.
- MULLA, M. J. et al. A Role for Uric Acid and the Nalp3 Inflammasome in Antiphospholipid Antibody-Induced IL-1 β Production by Human First Trimester Trophoblast. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–9, 2013.
- NAPSO, T. et al. Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific changes in placental phenotype in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16916, 28 dez. 2019.
- NAVARRO, V. M. Metabolic regulation of kisspeptin — the link between energy balance and reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 8, p. 407–420, 19 ago. 2020.
- NEUBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 18, n. 6, p. 409–416, dez. 2011.
- OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, 2001.
- PARK, D. W. et al. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 132–139, fev. 2012.
- PLAISIER, M. Decidualisation and angiogenesis. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 259–271, jun. 2011.
- RADOVICK, S.; BABWAH, A. V. Regulation of Pregnancy: Evidence for Major Roles by the Uterine and Placental Kisspeptin/KISS1R Signaling Systems. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 37, n. 4, p. 182–190, 2019.
- RAMAESH, T. et al. Kisspeptin-10 inhibits angiogenesis in human placental vessels ex vivo and endothelial cells in vitro. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5927–5934, 2010.

RANA, S. et al. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. **Circulation Research**, v. 124, n. 7, p. 1094–1112, 29 mar. 2019.

RENAUD, S. J. et al. Natural killer-cell deficiency alters placental development in rats. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 1, p. 145–158, 1 jan. 2017.

REYNOLDS, L. P. et al. Uteroplacental vascular development and placental function: An update. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 355–365, 2010.

REYNOLDS, R. M. et al. A role for kisspeptins in pregnancy: Facts and speculations. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 1–7, jul. 2009.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. **General and comparative endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 132–40, ago. 2007.

ROSARIO, G. X. et al. Intrauterine Fate of Invasive Trophoblast Cells. **Placenta**, v. 30, n. 5, p. 457–463, maio 2009.

ROSEWEIR, A. K.; KATZ, A. A.; MILLAR, R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. **Placenta**, v. 33, n. 5, p. 408–415, 2012.

SAHIN, E. et al. HYPOTHYROIDISM INCREASES EXPRESSION OF STERILE INFLAMMATION PROTEINS IN RAT HEART TISSUE. **Acta endocrinologica (Bucharest, Romania : 2005)**, v. 5, n. 1, p. 39–45, 2019.

SAHOO, D. K. et al. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 63–70, 1 mar. 2008.

SAJADIAN, M. et al. The Effect of Experimental Thyroid Dysfunction on Markers of Oxidative Stress in Rat Pancreas. **Drug Development Research**, v. 77, n. 4, p. 199–205, 1 jun. 2016.

SANTOS, B. R. et al. **Manganese porphyrin-based treatment blocks placental stress caused by maternal hypothyroidism and improves placental morphogenesis and fetal development in a rat experimental model** São PauloXX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology, , 2021.

SATO, Y. **Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling** **Molecular and Cellular Endocrinology** Elsevier Ireland Ltd, , 1 mar. 2020.

SCHOOTS, M. H. et al. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153–161, 1 set. 2018.

SCHWETZ, T. A.; REISSAUS, C. A.; PISTON, D. W. Differential stimulation of insulin secretion by glp-1 and kisspeptin-10. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 2003.

SEZER, S. D. et al. VEGF, PlGF and HIF-1 α in placentas of early- and late-onset pre-eclamptic patients. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 8, p. 797–800, 1 ago. 2013.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 15, p. 5057–5093, 2017.

SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 341–350, 1 mar. 2016.

SHIRSHEV, S. V. et al. The effect of kisspeptin on the functional characteristics of isolated NK cells. **Doklady Biological Sciences**, v. 464, n. 1, p. 267–9, 2015.

SHRIVASTAVA, D.; MASTER, A. Fetal Growth Restriction. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 70, n. 2, p. 103–110, 27 abr. 2020.

SILVA, J. F. et al. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 923, 2012.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 147, n. 6, p. 803–16, 1 jun. 2014.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. **Pathology, research and practice**, v. 211, n. 3, p. 226–34, 1 mar. 2015.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 9, p. 1774–1786, 2017.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female reproduction†. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 907–921, 14 maio 2018.

SILVA, J. F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell Adhesion & Migration**, v. 10, n. 1–2, p. 88–110, 3 mar. 2016.

SIWETZ, M. et al. TNF- α alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 4, p. 428–438, 11 abr. 2016.

SKORUPSKAITE, K. et al. Kisspeptin and neurokinin B interactions in modulating gonadotropin secretion in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 35, n. 6, p. 1421–1431, 1 jun. 2020.

SMETS, E. M. L. et al. Decreased plasma levels of metastin in early pregnancy are associated with small for gestational age neonates. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 4, p. 299–303, abr. 2008.

SOARES, M. J. et al. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta**, v. 33, n. 4, p. 233–243, abr. 2012.

SOARES, M. J. et al. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 58, n. 2-3-4, p. 247–259, 2014.

SOARES, M. J.; IQBAL, K.; KOZAI, K. Hypoxia and Placental Development. **Birth defects research**, v. 109, n. 17, p. 1309–1329, 16 out. 2017.

SOARES, M. J.; VARBERG, K. M.; IQBAL, K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 196–211, 1 jul. 2018.

SOLANO, M. E. et al. Identification of suitable reference genes in the mouse placenta. **Placenta**, v. 39, p. 7–15, mar. 2016.

SONG, W.-J. et al. Glucagon Regulates Hepatic Kisspeptin to Impair Insulin Secretion. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 667–681, abr. 2014.

SONG, W. et al. Intermittent Hypoxia Impairs Trophoblast Cell Viability by Triggering the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. **Reproductive Sciences**, v. 27, n. 2, p. 477–487, 3 fev. 2020.

SONIGO, C. et al. Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3791–3795, 1 out. 2012.

SOUZA, C. A. et al. Efeito do hipotireoidismo materno na expressão espaço-temporal de mediadores imunológicos e população de células natural killers na decídua e na glândula metrial de ratas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 177–190, jan. 2020.

SULLIVAN-PYKE, C. et al. Kisspeptin as a new serum biomarker to discriminate miscarriage from viable intrauterine pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 109, n. 1, p. 137- 141.e2, 1 jan. 2018.

TAO, J. et al. MiR-124–3p promotes trophoblast cell HTR-8/SVneo pyroptosis by targeting placental growth factor. **Placenta**, v. 101, n. June, p. 176–184, 2020.

TAYLOR, J. et al. Kisspeptin/KISS1R signaling potentiates extravillous trophoblast adhesion to type-I collagen in a PKC- and ERK1/2-dependent manner. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 1, p. 42–54, jan. 2014.

TERAO, Y. et al. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1678, n. 2–3, p. 102–110, 25 maio 2004.

THAXTON, J. E.; SHARMA, S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 482–491, 2010.

TORRY, D. S. et al. Placenta Growth Factor: Potential Role in Pregnancy. **American**

Journal of Reproductive Immunology, v. 41, n. 1, p. 79–85, jan. 1999.

VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 179–189, 2011.

VRACHNIS, N. et al. Placental growth factor (PlGF): A key to optimizing fetal growth. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 10, p. 995–1002, 2013.

WAHAB, F.; RIAZ, T.; SHAHAB, M. Study on the effect of peripheral Kisspeptin administration on basal and glucose-induced insulin secretion under fed and fasting conditions in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 1, p. 37–42, 2011.

WALTER, P.; RON, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081–1086, 25 nov. 2011.

WOLFE, A.; HUSSAIN, M. A. The emerging role(s) for kisspeptin in metabolism in mammals. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

WU, S. et al. Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 1, p. 47–54, jan. 2014.

XIE, F. et al. Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 117, n. 1, p. 99–108, jan. 2010.

YANG, Y. et al. Endoplasmic reticulum stress may activate NLRP3 inflammasomes via TXNIP in preeclampsia. **Cell and Tissue Research**, v. 379, n. 3, p. 589–599, 22 mar. 2020.

YOSHIHARA, A. et al. Inhibitory effects of methimazole and propylthiouracil on iodotyrosine deiodinase 1 in thyrocytes. **Endocrine journal**, v. 66, n. 4, p. 349–357, 25 abr. 2019.

YUNG, H. W. et al. Endoplasmic reticulum stress exacerbates ischemia-reperfusion-induced apoptosis through attenuation of Akt protein synthesis in human choriocarcinoma cells. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 3, p. 872–884, 13 mar. 2007.

YUNG, H. W. et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. **American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 451–462, ago. 2008.

YUNG, H. W. et al. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. **Journal of Pathology**, v. 234, n. 2, p. 262–276, 6 out. 2014.

YUNG, H. W. et al. Placental endoplasmic reticulum stress in gestational diabetes: the potential for therapeutic intervention with chemical chaperones and antioxidants. **Diabetologia**, v. 59, n. 10, p. 2240–2250, 12 out. 2016.

ZHANG, H. et al. Elevated expression of KiSS-1 in placenta of preeclampsia and its

effect on trophoblast. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 2, p. 99–115, jul. 2011.

ZHANG, H.; DONG, Y.; SU, Q. Perinatal hypothyroidism modulates antioxidant defence status in the developing rat liver and heart. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 185–189, fev. 2017.

ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 8 jan. 2010.

ZHANG, P. et al. Expression and Function of Kisspeptin during Mouse Decidualization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97647, 15 maio 2014.

ZIYARAA, M. A.; HAMDAN, F. B.; MOUSA, L. R. Correlation of Kisspeptin-10 level and fetal well-being in preeclamptic patients. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**, v. 55, n. 6, p. 840–846, 1 dez. 2016.

APÊNDICE I

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

- **Fixação**

Paraformol 4% - 24 horas

- **Desidratação**

Álcool 70% – 2 horas

Álcool 80% – 2 horas

Álcool 90% – 2 horas

Álcool Absoluto 1 – 2 horas

Álcool Absoluto 2 – 2 horas

- **Diafanização**

Xilol – 15 minutos

- **Inclusão em parafina**

Banho de parafina (58-60 °C) – 25 minutos

Emblocamento

Obs1.: Diluição de paraformol:

– 4 gramas de paraformol em 1 litro de PBS.

– Homogenizar com auxílio de um agitador/aquecedor magnético em temperatura de (50-58 °C).

Obs2.: Diluição de PBS:

– 7,2 gramas de NaCl

– 0,43 gramas de Fosfato de sódio monobásico

– 1,48 gramas de Fosfato de sódio bibásico

– 1 litro de água destilada

APÊNDICE II

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA E EOSINA

- **Desparafinização**
Estufa (58-60°C) – 10 minutos
Xilol I – 10 minutos
Xilol II – 10 minutos
- **Hidratação**
Álcool Absoluto 1 – 5 minutos
Álcool Absoluto 2 – 5 minutos
Álcool Absoluto 3 – 5 minutos
Álcool 90% – 5 minutos
Álcool 80% – 5 minutos
Álcool 70% – 5 minutos
Água destilada – 3 minutos
- **Coloração**
Hematoxilina – 40 segundos
Água corrente – 10 minutos
Eosina – 20 segundos
- **Desidratação**
Mergulhar rápido em água corrente
Mergulhar rápido no álcool absoluto 1
Mergulhar rápido no álcool absoluto 2
Álcool absoluto 2 – 15 minutos
Álcool absoluto 3 – 15 minutos
- **Diafinização**
Xilol 1 – 20 minutos
Xilol 2 – 5 minutos
Montagem de lâmina com bálsamo do Canadá

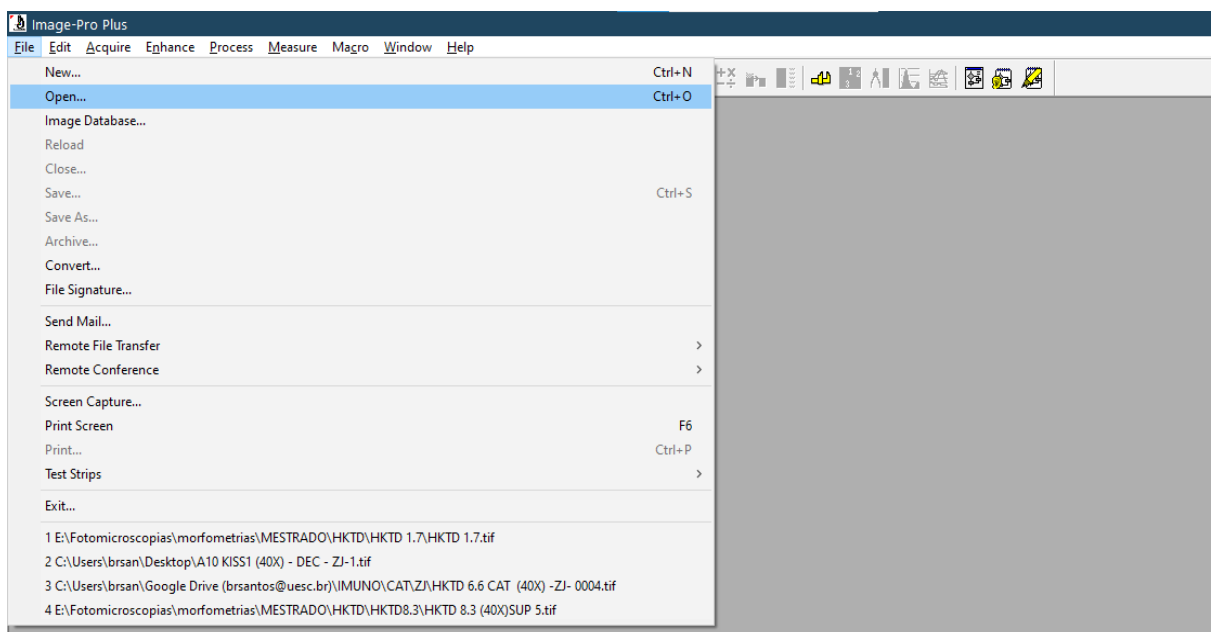
APÊNDICE III


PROTOCOLO DA ANÁLISE DE ESPESSURA PELO PROGRAMA IMAGE-PRO ® PLUS

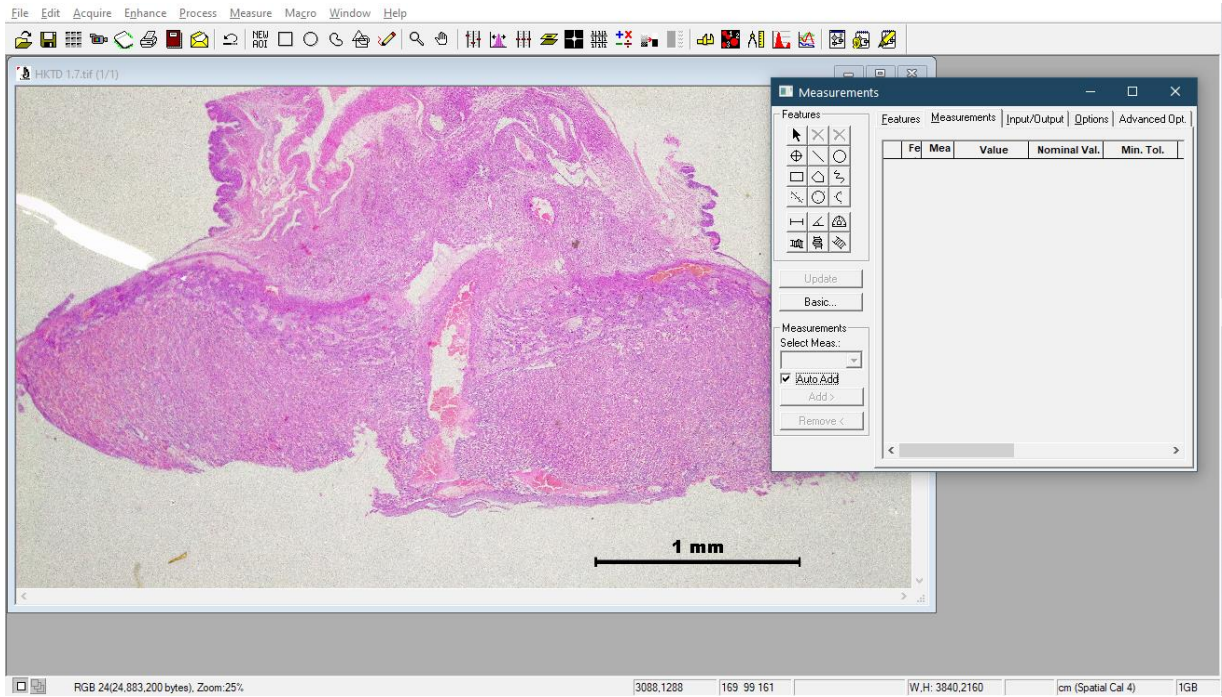
1. Abrir o programa IMAGE-PRO ® PLUS.exe


2. *File*

3. *Open (Ctrl+O)*- Escolher a imagem que deseja avaliar

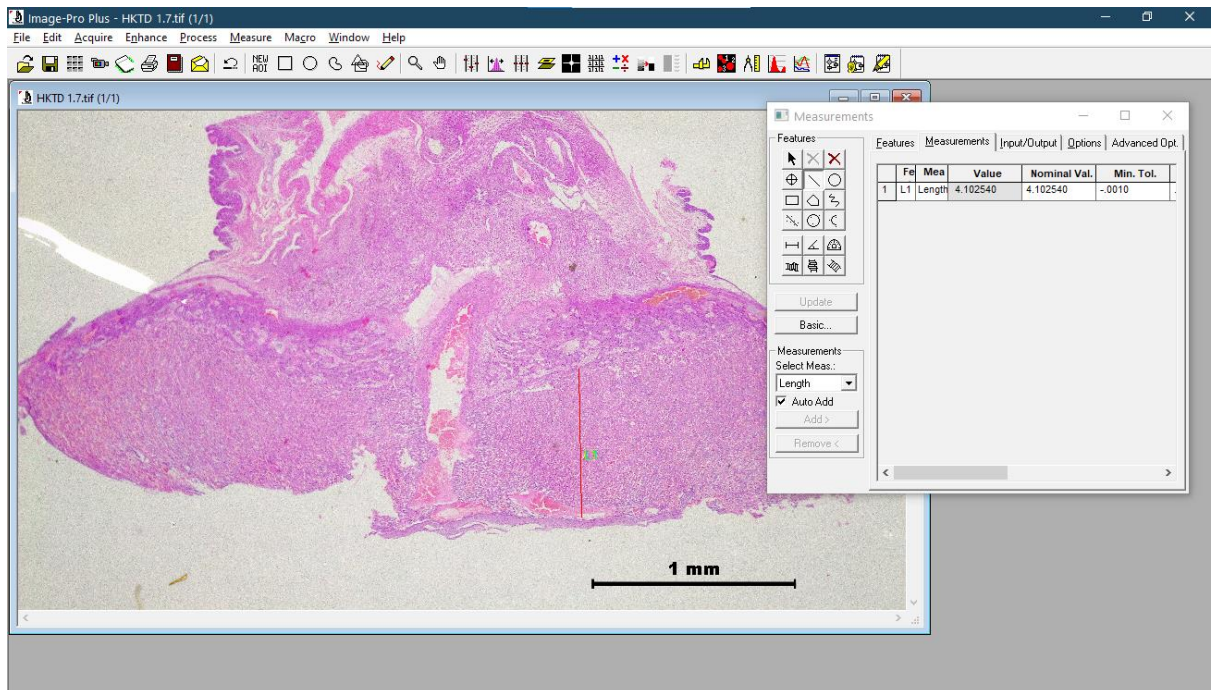


4. Clicar no ícone: 

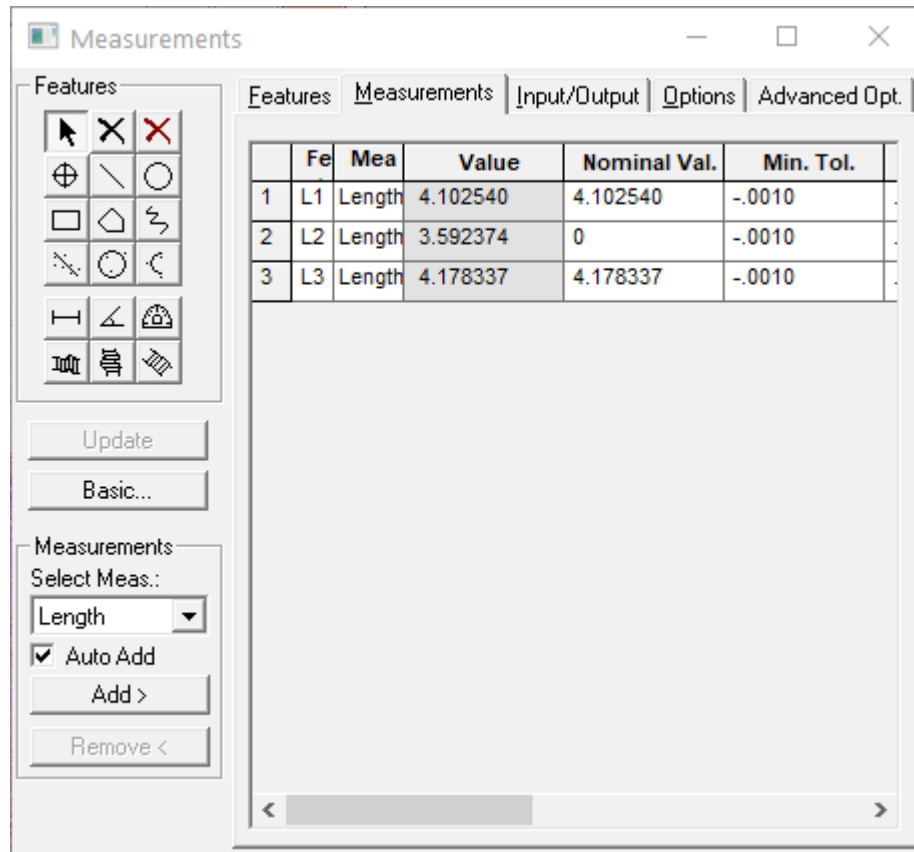


5. Clicar no ícone: 

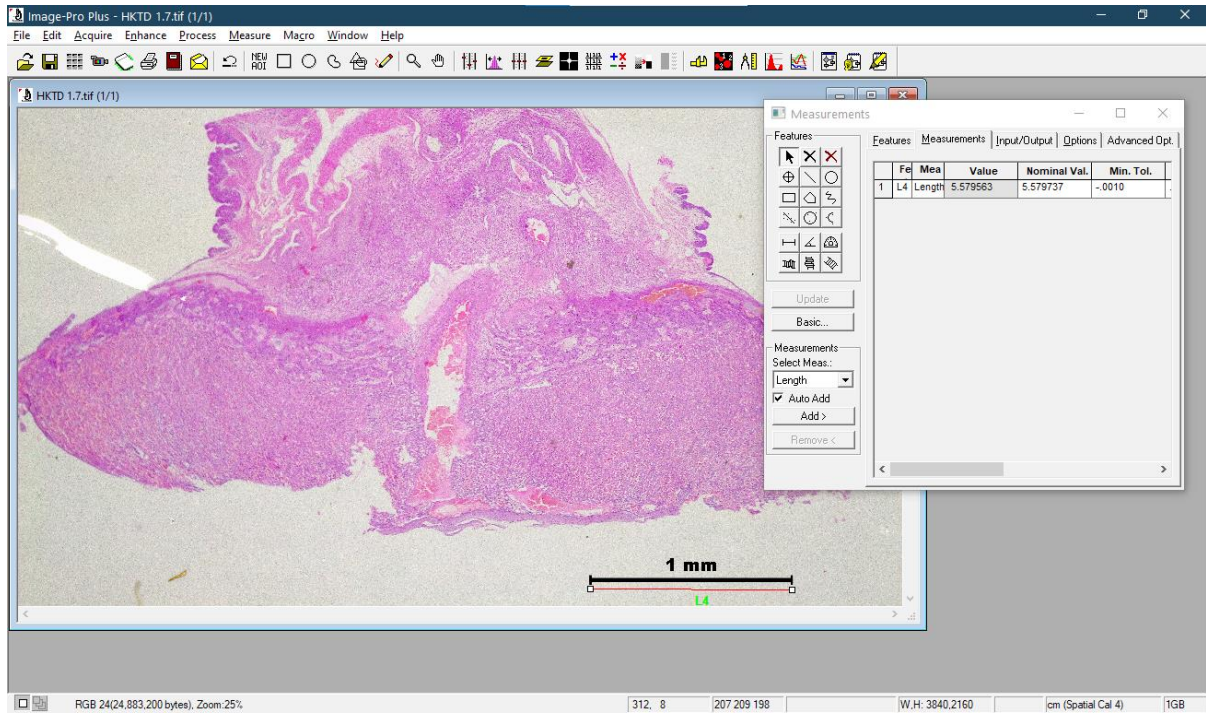
6. Arrastar o cursor para a região que deseja ser medida.



7. Faça quantos “traços” desejar, os dados medidos ficarão registrados na janela de “Measurements”, aba “Measurements” e na coluna de “Value”.



8. Para os valores serem convertidos para o *mm* é necessário realizar a medição da barra de escala presente na imagem, em seguida utilizar o valor obtido para fazer a devida conversão.



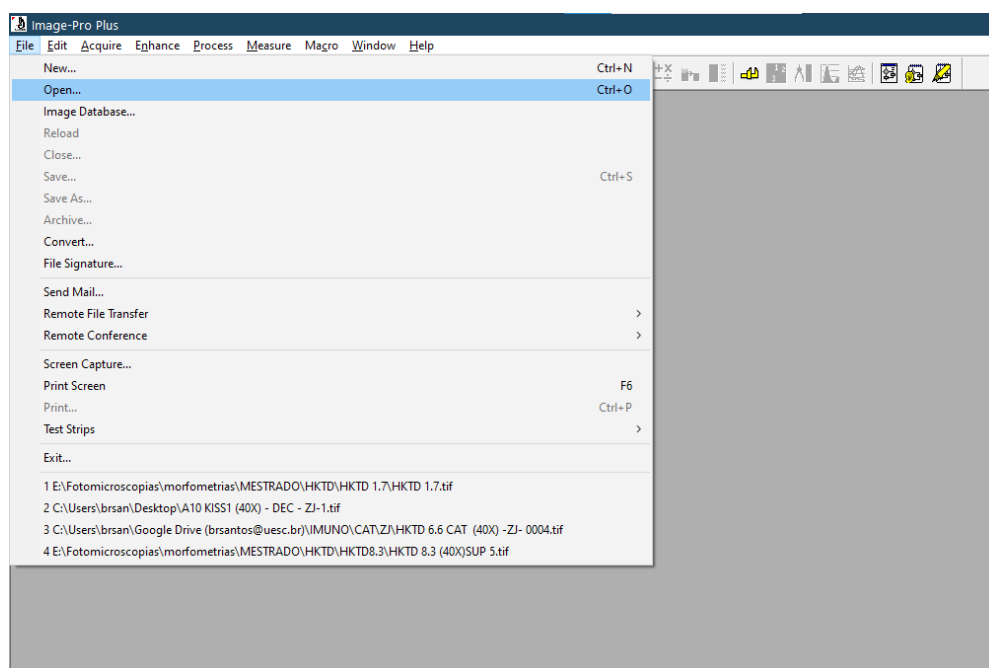
APÊNDICE IV

PROTOCOLO DA ANÁLISE DE ÁREA OCUPADA PELO PROGRAMA IMAGE-PRO ® PLUS

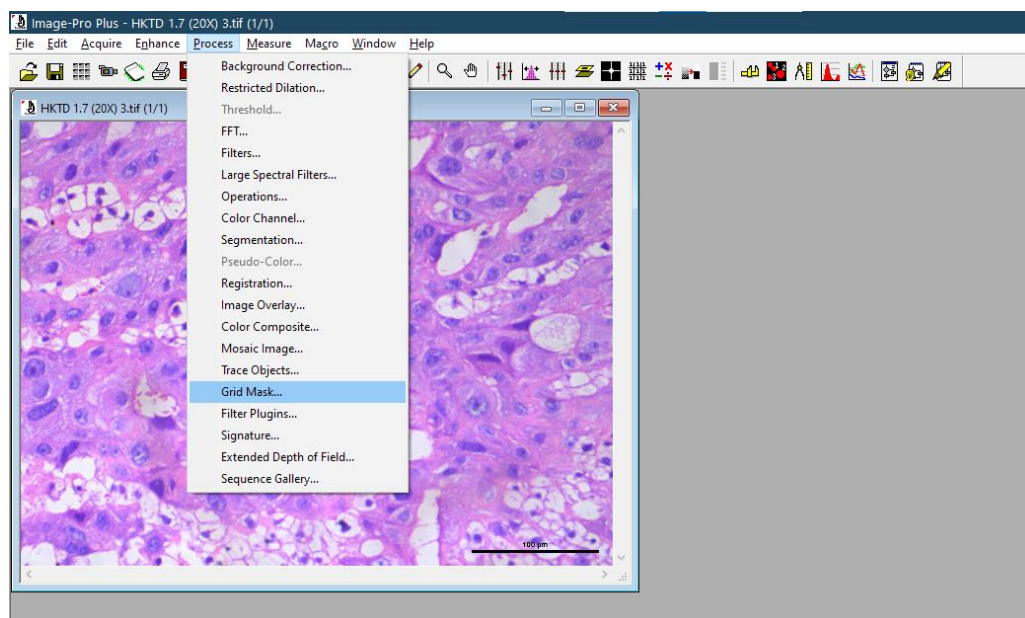
1. Abrir o programa IMAGE-PRO ® PLUS.exe

2. *File*

3. *Open (Ctrl+O)*- Escolher a imagem que deseja avaliar

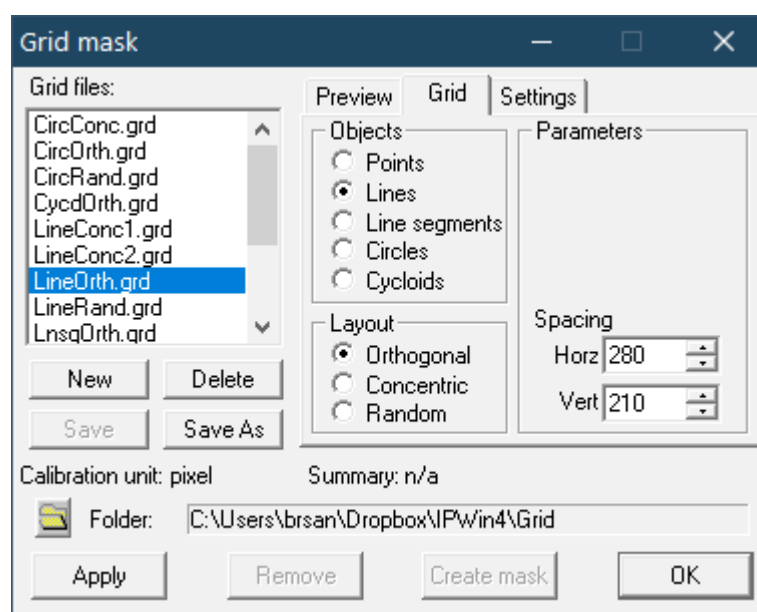


4. Process → Grid Mask



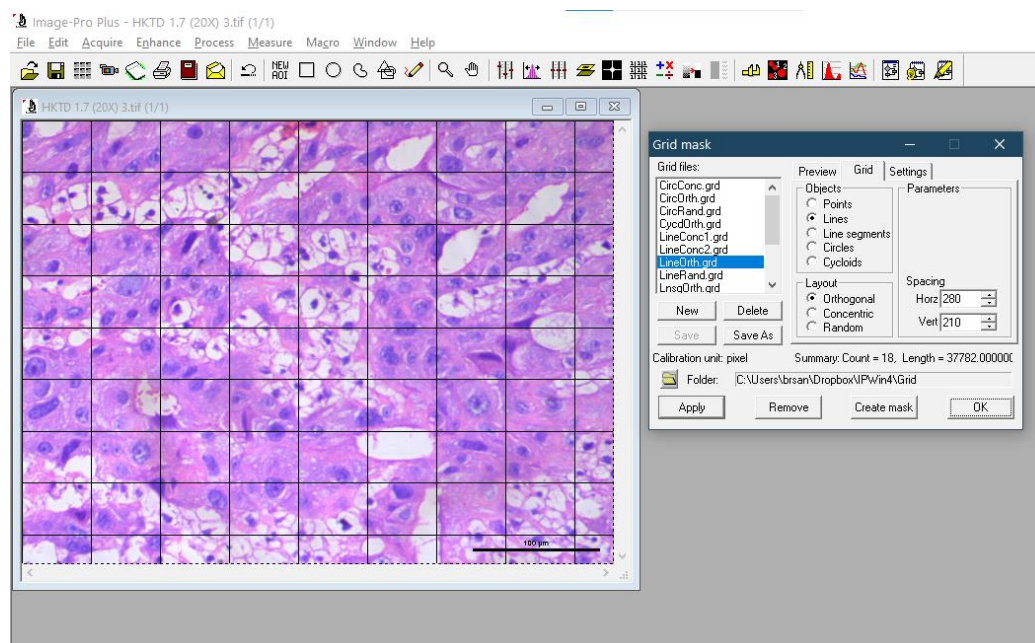
5. Selecionar as opções marcadas na imagem a baixo

Obs.: As configurações de *Spacing* são referentes aos espaços entre as linhas horizontais (*Horz*) e verticais (*Vert*), e vão variar de acordo ao número de pontos que deseja e tamanho da imagem analisada.



6. Apply.

Obs.: A janela de “Grid mask” não pode ser fechada durante a análise, e nem pode clicar em *OK*, se não a máscara será fechada. Para mudar de foto e manter as configurações, basta minimizar a janela e abrir uma nova imagem e aplicar a máscara na imagem seguinte.



APÊNDICE V

FIGURA 1 SUPLEMENTAR

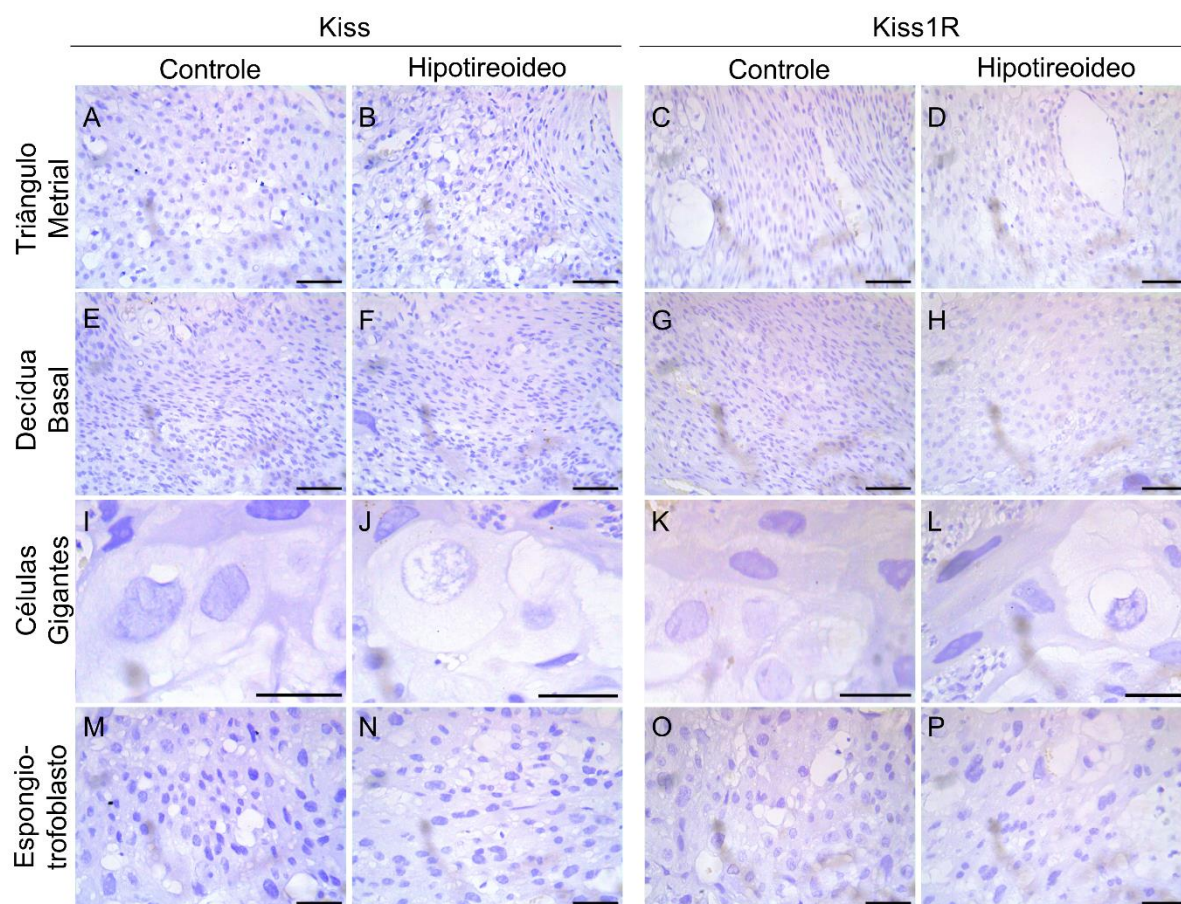


Figura 1 Suplementar: Expressão proteica de kisspeptina e seu receptor (Kiss1R) na interface materno-fetal das ratas controles e hipotireoideas aos 18 dias de gestação. A-P) Fotomicrografias de expressão imuno-histoquímica de Kiss e Kiss1R no triângulo metrial (A-D), decídua basal (E-H), células gigantes (I-L) e espongio-trofoblasto (M-P) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m).