

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JEANE MARTINHA DOS ANJOS CORDEIRO

**ESTRESSES OXIDATIVO E DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NA INTERFACE MATERNO-FETAL DE
RATAS: EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E
MEDIADORES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEINAS MAL
ENOVELADAS NO HIPOTIREOIDISMO MATERNO E
POTENCIAL TERAPÊUTICO DE PORFIRINAS DE
MANGANÊS (MnPs)**

**ILHÉUS – BA
2021**

JEANE MARTINHA DOS ANJOS CORDEIRO

**ESTRESSES OXIDATIVO E DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO NA INTERFACE MATERNO-FETAL DE
RATAS: EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E
MEDIADORES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEINAS MAL
ENOVELADAS NO HIPOTIREOIDISMO MATERNO E
POTENCIAL TERAPÊUTICO DE PORFIRINAS DE
MANGANÊS (MnPs)**

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

Linha de pesquisa: Clínica e Sanidade Animal
Sub-área: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. Mário Sérgio Lima de
Lavor e Profa. Dra. Jane Lima dos Santos

**ILHÉUS – BA
2021**

C794

Cordeiro, Jeane Martinha dos Anjos.

Estresses oxidativo e de retículo endoplasmático na interface materno-fetal de ratas: expressão de enzimas antioxidantes e mediadores da via de resposta a proteínas mal enoveladas no hipotireoidismo materno e potencial terapêutico de porfirinas de manganês (MnPs) / Jeane Martinha dos Anjos Cordeiro. – Ilhéus, BA: UESC, 2021.

136 f. : il.

Orientador: Juneo Freitas Silva.

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

Inclui referências e apêndice.

1. Patologia veterinária. 2. Estresse oxidativo. 3. Placentação. 4. Hipotireoidismo. 5. Ratos. I. Título.

CDD 636.089

JEANE MARTINHA DOS ANJOS CORDEIRO

**ESTRESSES OXIDATIVO E DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA INTERFACE
MATERNO-FETAL DE RATAS: EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E
MEDIADORES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS NO
HIPOTIREOIDISMO MATERNO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DE
PORFIRINAS DE MANGANÊS (MnPs)**

Ilhéus – Ba,

Dr. Juneo Freitas Silva
UESC/DCB(Orientador)

Dra. Jane Lima dos Santos
UESC/DCB (Co-orientadora)

Dra. Fabiana Lessa Silva
UESC/DCB

Dr. Alexandre Dias Munhoz
UESC/DCAA

Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua
USP/ICB

Dra. Rogéria Serakides
UFMG/EV

**ILHÉUS – BAHIA
2021**

Dedico aos meus pais Clóvis Paulo de Jesus Cordeiro (*in memorian*) e Janete Martinha dos Anjos Cordeiro que são minha base sólida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meu maior mestre, Deus, que durante todo este processo me guiou, protegeu, consolou e deu-me forças para persistir sem olhar para trás, nem para as dificuldades porque “*Meu Deus suprirá todas as vossas necessidades segundo as suas riquezas na glória em Cristo Jesus.*” Filipenses 4v19.

Agradeço ao meu pai Clóvis (*in memorian*), que se foi antes de ver mais este sonho realizado, e a minha mãe Janete, pais maravilhosos que me instruíram no caminho correto que eu deveria seguir, e que são meu alicerce, minha base forte.

A meus irmãos Fábio, Clemilton e Claudionor. À minha cunhada e irmã Marcela obrigada por todo apoio e carinho, a minha cunhada Sheila, aos meus sobrinhos Ester Beatriz, Daniel Cordeiro, Marcos Paulo e todos os outros.

Agradeço às minhas tias Ana e Cosmira, ao meu tio Antônio Martins (*in memorian*) que sempre torceram, ajudaram e se alegram com minhas vitórias. Agradeço a prima Erlândia e demais familiares.

Ao meu orientador, Professor Juneo, por acreditar em meu potencial e ter permitido que eu continuasse realizando meu sonho, por toda orientação, dedicação, ensinamentos, paciência e busca pelo melhor de cada um de seus orientados.

Ao grupo NuRE, Luciana, Acácia, Adriana, Isabela, Larissa, Letícia, Brenda, Natália, Maria Clara, Erikles, Thayná, em especial a Emilly e Bia muito obrigada por todo apoio e carinho.

Agradeço ao meu querido “anjo” Luciano, meu conselheiro, amigo, co-orientador, não tenho como te agradecer por tudo que você fez por mim.

A meus pastores Roberto Diogo e Ivete, e aos demais irmãos que oraram por mim.

Aos meus amigos que me incentivaram a persistir e nunca desistir dos meus sonhos, em especial a Josiele, Joana, Jamille, Marta, Larissa, Uallisson, Josiane, Anaíris e Gilcéria. Amo muito todos vocês.

A todos os professores pelos ensinamentos, conselhos e dedicação, que cooperaram muito para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos demais colegas do PPGCA, William, Cristiane, Gisele Dias em especial a querida Gabriela Mota, muito obrigada.

À minha amiga, irmã, professora, conselheira Dra. Paula Elisa Guedes, por toda a ajuda oferecida durante toda a minha trajetória profissional, mesmo nesse ano atípico em que

estávamos separadas fisicamente, mas juntas em pensamentos.

Ao técnico do laboratório de histopatologia Ivo Arouca; Seu Zé (do biotério), à técnica da Sala de Esterilização e Lavagem de Material Laboratorial, Maria Fabiana dos Santos, a Jamile, técnica do CME.

A minha querida Jacira pelo carinho, cuidado e amizade.

A Universidade Estadual de Santa Cruz, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e à Fapesb, pela oportunidade de realização do Curso.

Aos animais que participaram do projeto.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para o meu conhecimento e crescimento acadêmico e pessoal.

ESTRESSES OXIDATIVO E DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA INTERFACE MATERNO-FETAL DE RATAS: EXPRESSÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E MEDIADORES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS NO HIPOTIREOIDISMO MATERNO E POTENCIAL TERAPÊUTICO DE PORFIRINAS DE MANGANÊS (MnPs)

RESUMO

O estresse oxidativo (EO) e o estresse de retículo endoplasmático (ERE) estão entre as principais causas da disfunção feto-placentária observada na pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino e aborto. No entanto, ainda não há informações se o hipotireoidismo materno também causa estresse na interface materno-fetal e sobre o perfil de mediadores antioxidantes e da resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) na placenta ao longo da gestação. Esses mesmos mediadores também estão envolvidos no desenvolvimento adequado da placenta. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão do HIF1 α , de enzimas antioxidantes e mediadores da UPR durante a placentação de ratas (**Capítulo 1**) e verificar se o hipotireoidismo materno causa EO e ERE na interface materno-fetal (**Capítulo 2**). Além disso, avaliamos o potencial terapêutico de duas porfirinas de manganês, MnIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIT5B3EPyP (MnP II), na disfunção feto-placentária de ratas hipotireoideas (**Capítulo 3**), uma vez que MnPs têm apresentado alto poder antioxidante, mas ainda não foram avaliadas em doenças gestacionais. Para isso, três experimentos foram realizados utilizando ratas Wistar (7-8 animais/grupo). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil (4mg/Kg/dia) e o tratamento com as MnPs (0,1mg/Kg/dia) iniciou-se no 8º dia de gestação (DG) (CEUA nº 002/17). No **Capítulo 1** avaliou-se a expressão placentária de enzimas antioxidantes (SOD1, GPX1, Catalase), mediadores da UPR (ATF6, PERK, GRP78, CHOP) e de hipóxia (HIF1 α) no 10º, 12º, 14º, 16º e 18º DG. No **Capítulo 2** avaliou-se o desenvolvimento feto-placentário e a expressão decidual e placentária de mediadores antioxidantes (Sod1, Sod2, Cat, Gpx1/2, GST, Nrf2), de hipóxia (Hif1 α), de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG) e da UPR (Perk, Atf6, Atf4, Xbp1, HO1, Grp78 e Chop) no 14º e 18º DG. No **Capítulo 3** avaliou-se o potencial terapêutico de duas MnPs, MnIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIT5B3EPyP (MnP II) no desenvolvimento feto-placentário e a expressão placentária e decidual de mediadores antioxidantes (SOD1, CAT, GPx1, GST), de hipóxia (HIF1 α), de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG), de ERE (GRP78 e CHOP), imunológicos (TNF α e IL-10) e angiogênicos (VEGF). No **Capítulo 1**, maior imunomarcagem placentária de HIF1 α foi observada no 16º e 18º DG, enquanto SOD1 e CAT apresentaram maior imunomarcagem aos 14 e 18 DG. GPx1/2, GRP78 e CHOP apresentaram maior imunomarcagem aos 18 DG. Em relação à expressão gênica, *Hif1 α* e *Sod1* apresentaram maior expressão de mRNA no 12º e 16º DG. Em relação a *GPx1*, foi observada maior expressão no 10º e 16º DG, enquanto *Cat*, *Perk* e *Grp78* apresentaram maior expressão gênica no 14º DG, diferentemente de *Atf6* que teve maior expressão no 12º DG. *Chop*, por outro lado, manteve expressão elevada do 12º até o 18º DG, sugerindo ativação de ERE ao final da gestação. No **Capítulo 2**, a redução do peso fetal e placentário nas ratas hipotireoideas foi associada com maior imunomarcagem decidual e/ou placentária de Hif1 α , 8-OHdG, SOD1, GPx1/2, Grp78 e CHOP aos 14 DG, enquanto houve redução da expressão gênica placentária e/ou decidual de *Sod1*, *Gpx1*, *Atf6*, *Perk*, *Ho1*, *Xbp1*, *Grp78* e *Chop* no mesmo período gestacional. Já aos 18 DG, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem decidual e/ou placentária de Hif1 α , 8-OHdG, ATF4, Grp78 e CHOP, enquanto reduziu a imunomarcagem e atividade enzimática de SOD, CAT, GST. O hipotireoidismo também aumentou a expressão placentária de mRNA para *Hif1 α* , *Nrf2*, *Sod2*, *Gpx1*, *Cat*, *Perk*, *Atf6* e *Chop* aos 18 DG, enquanto reduziu a expressão decidual de *Sod2*, *Cat* e *Atf6*. No **Capítulo 3**,

as MnPs aumentaram o peso fetal das ratas hipotireoideas, além da MnP I aumentar o peso dos órgãos fetais. As MnPs I e II restabeleceram a morfologia da zona juncional e aumentaram a vascularização na placenta. As MnPs bloquearam o aumento de mediadores de EO e ERE causado pelo hipotireoidismo, mostrando níveis de expressão de HIF1 α , 8-OHdG, Gpx1, Grp78 e Chop semelhante ao controle, além de terem aumentado a expressão proteica de SOD1, Cat e GPx1/2 e restaurado a expressão de IL-10 e VEGF na decídua e/ou placenta. No entanto, as MnPs não restauraram a baixa atividade enzimática placentária de SOD, CAT e GST causada pelo hipotireoidismo, enquanto aumentaram a expressão decidual e placentária de TNF α . Este estudo demonstrou que a expressão placentária de enzimas antioxidantes e mediadores da UPR em ratas é influenciada pela idade gestacional, com maior expressão nos períodos de hipóxia e ao final da gestação, e que a restrição feto-placentária observada no hipotireoidismo está associada com a ativação de EO e ERE na interface materno-fetal. Além disso, o tratamento com MnPs melhora o desenvolvimento feto-placentário e protege contra o EO e ERE causado pelo hipotireoidismo em ratas, sugerindo seu uso como uma ferramenta terapêutica promissora para as disfunções gestacionais que cursam com estresse placentário.

Palavras-chave: estresse placentário; hipotireoidismo; metaloporfirinas; placentação; antioxidantes; rata.

OXIDATIVE AND ENDOPLASM RETICULUM STRESS AT THE MATERNAL FETAL INTERFACE OF RATS: EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND MEDIATORS OF THE UNFOLDED PROTEINS RESPONSE PATHWAY IN MATERNAL HYPOTHYROIDISM AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF MANGANESE PORPHYRIINS (MnPs)

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) and endoplasmic reticulum stress (ERS) are among the main causes of fetoplacental dysfunction seen in pre-eclampsia, intrauterine growth restriction, and abortion. However, there is still no information on whether maternal hypothyroidism also causes stress at the maternal-fetal interface and on the profile of antioxidant mediators and the unfolded protein response (UPR) in the placenta throughout pregnancy. These same mediators are also involved in the proper development of the placenta. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression profile of HIF1 α , antioxidant enzymes and UPR mediators during placentation in rats (**Chapter 1**) and whether maternal hypothyroidism causes OS and ERS at the maternal-fetal interface (**Chapter 2**). In addition, we evaluated the therapeutic potential of two manganese porphyrins, MnIIIT2EPyP (MnP I) and MnIIIT5B3EPyP (MnP II), in the fetoplacental dysfunction of hypothyroid rats (**Chapter 3**), since MnPs has shown high antioxidant power, but still have not been evaluated for gestational disorders. For this, three experiments were carried out using Wistar rats (7-8 animals/group). Hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil (4mg/Kg/day) and treatment with MnPs (0.1mg/Kg/day) started on the 8th day of pregnancy (DG) (CEUA n° 002/17). In **Chapter 1**, the placental expression of antioxidant enzymes (SOD1, GPX1, Catalase) and UPR (ATF6, PERK, GRP78, CHOP) and hypoxia (HIF1 α) mediators were evaluated at 10, 12, 14, 16 and 18 DG. In **Chapter 2**, the fetoplacental development and placental and decidual expression of antioxidant (Sod1, Sod2, Cat, Gpx1/2, GST, Nrf2) and hypoxia (Hif1 α) mediators were analyzed at 14 and 18 DG, as well the expression of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, and UPR mediators (Perk, Atf6, Atf4, Xbp1, HO1, Grp78 and Chop). In **Chapter 3**, the fetoplacental development and placental expression of antioxidant (SOD1, CAT, GPx1, GST) and hypoxia (HIF1 α) mediators, oxidative DNA damage marker (8-OHdG), and ERS (GRP78 and CHOP), immunological (TNF α and IL-10) and angiogenic (VEGF) mediators were evaluated at 18 DG. In **Chapter 1**, higher placental immunostaining of HIF1 α was observed at 16 and 18 DG, while SOD1 and CAT showed higher immunostaining at 14 and 18 DG. GPx1/2, GRP78 and CHOP showed higher immunostaining at 18 DG. Regarding gene expression, *Hif1 α* and *Sod1* showed higher mRNA expression at 12 and 16 DG. Regarding *GPx1*, higher expression was observed at 10 and 16DG, while *Cat*, *Perk* and *Grp78* showed higher gene expression at 14 DG, unlike *Atf6*, which had higher expression in the 12th DG. *Chop*, on the other hand, maintained high expression from the 12th to the 18th day of pregnancy, suggesting ERS activation at the end of pregnancy. In **Chapter 2**, reduced fetal and placental weight in hypothyroid rats was associated with increased decidual and/or placental immunostaining of Hif1 α , 8-OHdG, SOD1, GPx1/2, Grp78 and CHOP at 14 DG, while there was a reduction in gene expression placental and/or decidual of Sod1, Gpx1, Atf6, Perk, Ho1, Xbp1, Grp78 and Chop in the same gestational period. At 18 DG, hypothyroidism increased the decidual and/or placental immunostaining of Hif1 α , 8-OHdG, ATF4, Grp78 and CHOP, while it reduced the immunostaining and enzymatic activity of Sod1, CAT, GST. Hypothyroidism also increased placental mRNA expression for *Hifa*, *Nrf2*, *Sod2*, *Gpx1*, *Cat*, *Perk*, *Atf6* and *Chop* at 18 DG, while decreasing the decidual expression of *Sod2*, *Cat* and *Atf6*. In **Chapter 3**, MnPs increased the fetal weight of hypothyroid rats, in addition to MnP I increasing the weight of fetal organs. MnPs I and II restored the morphology of the junctional

zone and increased placental vascularization. MnPs blocked the increase of OS and ERS mediators caused by hypothyroidism, showing similar levels of expression of HIF1 α , 8-OHdG, Gpx1, Grp78 and Chop to the control, in addition to increasing the protein expression of SOD1, Cat and GPx1/2 and restored IL10 and VEGF expression in the decidua and/or placenta. However, MnPs did not restore the low placental enzyme activity of SOD, CAT and GST caused by hypothyroidism, while increasing the decidual and placental expression of TNF α . This study demonstrated that the placental expression of antioxidant enzymes and UPR mediators in female rats is influenced by gestational age, with greater expression in the periods of hypoxia and at the end of pregnancy, and that the fetal-placental restriction observed in hypothyroidism is associated with activation of OS and ERS at the maternal-fetal interface. Furthermore, treatment with MnPs improves fetal-placental development and protects against OS and ERS caused by hypothyroidism in female rats, suggesting a promising therapeutic tool for gestational disorders associated with placental stress.

Keywords: placental stress; hypothyroidism; metalloporphyrins; placentation; antioxidants; rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Perfil de expressão de HIF α na placenta de ratas ao longo da gestação. A) Fotomicrografias da imunomarcação de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B) Área de imunomarcação em pixels de HIF1 α na zona juncional e labirinto placentário. C) Expressão gênica relativa do *Hif1 α* na placenta de ratas aos 10, 12, 14,16 e 18 DG (média $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.....45

Figura 2. Perfil de expressão das enzimas antioxidantes SOD1, GPx e catalase na placenta de ratas ao longo da gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcação de SOD1, GPx1/2 e catalase na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B-F) Área de imunomarcação em pixels de SOD1 (B), GPx1/2 (D) e catalase (F) na zona juncional e labirinto placentário. E) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Gpx1* e *Cat* na placenta de ratas aos 10, 12, 14,16 e 18 DG (média $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.....46

Figura 3. Perfil da expressão de mediadores da UPR na placenta de ratas ao longo da gestação. A-C) Fotomicrografias da imunomarcação de GRP78 e CHOP na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50 μ m). D-D) Área de imunomarcação em pixels de GRP78 (B) e CHOP (D) na zona juncional e labirinto placentário. E) Expressão gênica relativa de *Atf6*, *Perk*, *Grp78* e *Chop* na placenta de ratas aos 10, 12, 14,16 e 18 DG (média $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.....48

CAPÍTULO 2

Figura 1. Expressão de HIF1 α e *Nrf2* na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcação de HIF1 α na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50 μ m). C-D) Área de imunomarcação em pixels do HIF1 α na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Hif1 α* (E,G) e *Nrf2* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (E,F) e 18 (G,H) DG. (média $\pm$ SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.....62

Figura 2. Expressão de 8-OHdG na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcação de 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50 μ m). C-D) Área de imunomarcação em pixels do 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG (média $\pm$ SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.....63

Figura 3. Expressão de SOD1 e Sod2 na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de SOD1 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C-D) Área de imunomarcção em pixels do SOD1 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (M) e 18 (N) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Sod1* (E,G) e *Sod2* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (E,F) e 18 (G,H) DG. (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.....65

Figura 4-Expressão de GPx na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de GPx1/2 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C,E) Área de imunomarcção em pixels do GPx1/2 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. N,P) Expressão gênica relativa de *Gpx1* na decídua e placenta aos 14 (D) e 18 (F) DG. (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; Teste t de Student; N=6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.....66

Figura 5-Expressão de catalase na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de catalase na decídua , zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C,E) Área de imunomarcção em pixels de catalase na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. F,H) Expressão gênica relativa de *Cat* na decídua e placenta aos 14 (D) e 18 (F) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação..... 67

Figura 6- Atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta de ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A) Atividade enzimática de SOD (U/mg/proteína); B) atividade enzimática de catalase (U/mg/proteína); C) Atividade enzimática de GST(nmol/min/mg proteína); (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; ****p<0.0001; Teste t de Student; N= 6-7/grupo).....68

Figura 7. Expressão de Atf6 e Perk na decídua e placenta de ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação.A-D) Expressão gênica relativa do *Perk* (A,C) e *Atf6* (B,D) na placenta e decídua aos 14 (A,B) e 18 (C,D) DG (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo) DEC= decídua; PLA= placenta; DG= dias de gestação.....69

Figura 8-Expressão de ATF4, Ho1 e Xbp1 na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de ATF4 na decídua , zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C-D) Área de imunomarcção em pixels do ATF4 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Ho1* (E,G) e *Xbp1* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (O,P) e 18 (Q,R) DG. (média±SEM, *p<0.05; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.....70

Figura 9-Expressão de GRP78 na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação.A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de GRP78 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C,E) Área de imunomarcção em pixels de GRP78 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. D,F) Expressão gênica relativa de *Grp78* na decídua e placenta aos 14 (N) e 18 (P) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua;

ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação..... 71

Figura 10-Expressão de CHOP na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcagem de CHOP na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contraincolorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). C,E) Área de imunomarcagem em pixels de CHOP na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. D,F) Expressão gênica relativa de *Chop* na decídua e placenta aos 14 (N) e 18 (P) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação..... 72

CAPÍTULO 3

Figura 1. Estrutura química das MnPs..... 82

Figura 2. Parâmetros reprodutivos de ratas tratadas com MnPI e MnPII durante a gestação.A) Peso útero-placentário/ nºfetos (g); B) Peso do líquido amniótico/nº fetos C) Número de fetos / fêmea e D) Peso dos fetos (g)(média±SEM; *p<0,05; Teste SNK; N= 3-7/grupo (A-C); N= 22/grupo (D)). 86

Figura 3- Dosagem plasmática de T4 livre no dia 0 de gestação e parâmetros reprodutivos das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Dosagem plasmática T4 livres no dia 0 de gestação; B) Peso utero-placentário/nºfetos; C) Peso do líquido amniótico/ nº fetos (g); D) Número de fetos/ fêmea; E) Peso fetal (g); F-I) Peso do fígado (F), rim (G), coração (H) e pulmão (I) fetal (g) (média±SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; Teste SNK; N=5-6/grupo (A-C); N= 22/grupo (D); N= 19-31/grupo (F-I)). 88

Figura 4. Análise histomorfométrica da placenta das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Fotomicrografia da interface materno-fetal evidenciando a decídua e placenta aos 18 DG; B-D) Fotomicrografias das camadas da placenta evidenciando a camada de células gigantes (B) e o espongiotrofoblasto (C) da ZJ e o LP (D) (Coloração de Hematoxilina e eosina; Bar= 500µm (A); 50µm (B-D)). E) Espessura da ZJ (células gigantes+espongiotrofoblasto) e LP; F) Porcentagem de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes na zona juncional (média±SEM; *p<0,05; **p<0,01; Teste SNK; N= 8/grupo); G) Porcentagem de área ocupada por seio vascular materno, capilar fetal e mesênquima fetal/trofoblasto do LP (média±SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; Teste SNK; N= 10/grupo). DB= Decídua Basal; ZJ= Zona Juncional; LP= Labirinto Placentário; VC= Vaso central; CG= células gigantes trofoblásticas; EP= espongiotrofoblastos; Seta= seio vascular materno, Cabeça de seta= Células de glicogênio.....90

Figura 5. Expressão de HIF1α e Nrf2 na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Fotomicrografias da imunomarcagem de HIF1α na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contraincolorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). B) Área de imunomarcagem em pixels do HIF1α na decídua, zona juncional e labirinto placentário; C) Expressão gênica relativa do *Hif1α* e *Nrf2* na placenta (média±SEM, *p<0,05; **p<0,01; Teste SNK; N= 6-8/grupo) DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.....91

Figura 6. Expressão de 8-OHdG na decídua e placenta de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação A) Fotomicrografias da

imunomarcção de 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). B) Área de imunomarcção em pixels do 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário (média±SEM, **p<0.01; ***p<0.001; Teste t de *Student*; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.....92

Figura 7. Expressão e atividade de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcção de SOD1 (A), GPx1 (C) e catalase (E) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 µm). B,D,F) Área de imunomarcção em pixels de SOD1 (B), GPx1 (D) e catalase (F) na decídua, zona juncional e labirinto placentário. G) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Gpx1* e *Cat* na placenta. H) Atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta (média ± SEM, *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário..... 94

Figura 8. Expressão de GRP78 e CHOP na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A-C) Fotomicrografias da imunomarcção de GRP78 (A) e CHOP (C) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). B-D) Área de imunomarcção em pixels de GRP78 (B) e CHOP (D) na decídua, zona juncional e labirinto placentário; E) Expressão gênica relativa de *Grp78* e *Chop* na placenta (média±SEM, *p< 0,05; **p< 0,01; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.....96

Figura 9. Expressão de VEGF, TNFα e IL10 na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcção de VEGF (A), TNFα (C) e IL10 (E) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Bar= 50µm). B,D,F) Área de imunomarcção em pixels de VEGF (B), TNFα (D) e IL10 (F) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (média±SEM, *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.....	43
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.....	59
--	----

Tabela 2. Dosagem plasmática de T3 e T4 livres no dia 0 de gestação e parâmetros reprodutivos das ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação.....	60
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.....	85
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANGs	Angiopietinas
AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Adenosina trifosfato
ATF 4	Fator de transcrição de ativação 4
ATF6	Fator de transcrição de ativação 6
CAT	Catalase
CK	Creatina kinase
CDNB	1 cloro 2,4 dinitrobenzeno
CHOP	Proteína homóloga pró-apoptótica C/EBP
DAB	Diaminobenzidina
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
E2	Estradiol
elF2 α	Fator 2 alfa de iniciação eucariótica
EO	Estresse oxidativo
ERE	Estresse de Retículo Endoplasmático
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERAD	ER-associated protein degradation
EVTs	Células trofoblásticas extravilosas
FA	Fosfatase alcalina
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GPx1	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione s-transferase
GR	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
GRP78	Proteína reguladora de glicose 78
H ₂ O ₂	Peróxidos de hidrogênio
HE	Hematoxilina-Eosina
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
HO1	Heme oxygenase 1
HO ₂ ·	Hidroperoxila
HTs	Hormônios tireoidianos
HPT	Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
H ₂ S ₂	Dissulfeto de hidrogênio
I κ B α	Inibidor nuclear do fator kappa B
IGFBP1	Proteína-1 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-10	Interleucina 10
IRE1 α	Enzima 1 α requerente de inositol
LH	Hormônio Luteinizante
LP	Labirinto placentário
MDA	Malondialdeído
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9

MnP	Porfirina de manganês
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nf-κB	Fator Nuclear-κB
NKs	Célula Natural Killer
NRF2	fator Nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2
NOS2	Oxido nítrico sintetase-2
O ₂ ⁻	Superóxidos
OH-	Hidroxilas
¹ O ₂	Oxigênio singlete
P4	Progesterona
PBS	Solução Fosfato Tamponada
PERK	Quinase do RE semelhante à proteína quinase do RNA
PIGF	Fator de crescimento placentário
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PRL	Prolactina
PT	Proteínas totais
PTU	6-propyl-2-thiouracil
qPCR	Polymerase Chain Reaction (PCR em tempo real)
ROO [•]	Peroxila
RO [•]	alcoxila
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
SNK	Student Newman Keuls
SOD 1 e 2	Superóxido dismutase 1 e 2
SODm	miméticos de superóxido dismutase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFK	Tampão de fosfato de potássio
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
T3	Tiroxina
T4	Triiodotironina
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TPO	Peroxidase tireoidiana
TRH	Hormônio liberador de tireotropina
uNKs	Células Natural Killers Uterinas
UPR	Unfolded Protein Response
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
XBP1	Proteína 1 de ligação a caixa X
ZJ	Zona juncional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVO GERAL	24
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4REVISÃO DE LITERATURA.....	25
4.1 INTERFACE MATERNO-FETAL	25
4.1.1Decídua	25
4.1.2 Placentação.....	27
4.2 HIPOTIREOIDISMO E DISFUNÇÃO PLACENTÁRIA.....	29
4.3 ESTRESSE PLACENTÁRIO	31
4.3.1Estresse oxidativo.....	31
4.3.2Estresse de reticulo endoplasmático	34
4.4PORFIRINAS DE MANGANÊS (MnPs)	36
5 CAPÍTULO 1.....	38
5.1 RESUMO	39
5.2 ABSTRACT.....	39
5.3INTRODUÇÃO	40
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.4.1 Delineamento experimental.....	41
5.4.2 Eutanásia e coleta de material.....	41
5.4.3 Imuno-histoquímica (IHC).....	42
5.4.4 PCR em tempo real (qPCR)	43
5.4.5ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.5 RESULTADOS.....	44
5.5.1Perfil de expressão de <i>HIF1α</i> na placenta de ratas ao longo da gestação	44
5.5.2 Perfil de expressão de enzimas antioxidantes na placenta de ratas ao longo da gestação.....	45
5.5.3 Perfil de expressão de mediadores da UPR na placenta de ratas ao longo da gestação.....	46
5.6 DISCUSSÃO	48
6CAPÍTULO 2.....	52
6.1 RESUMO	53
6.2 ABSTRACT.....	53
6.3 INTRODUÇÃO	54
6.4MATERIAL E MÉTODOS	56
6.4.1 Delineamento experimental.....	56
6.4.2 Necropsia e coleta de material.....	56
6.4.3 Análise hormonal	57
6.4.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	57
6.4.5 PCR em tempo real (qPCR)	58
6.4.6 Avaliação da atividade enzimáticade SOD, glutathiona transferase (GST) e Catalase	59
6.4.7ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
6.5 RESULTADOS.....	60
6.5.1 O hipotireoidismo materno compromete o desenvolvimento feto-placentário	60

6.5.2 O hipotireoidismo materno aumenta a expressão de HIF1 α e Nrf2 na interface materno-fetal	60
6.5.3 O hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo na interface materno-fetal ...	63
6.5.4 O hipotireoidismo materno desregula a expressão de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal.....	64
6.5.5 O hipotireoidismo materno reduz a atividade enzimática placentária de SOD, Catalase e GST no final da gestação	67
6.5.6 O hipotireoidismo materno desregula a expressão de mediadores da UPR e causa estresse reticular na interface materno-fetal	68
6.6 DISCUSSÃO	72
7 CAPÍTULO 3	77
7.1 RESUMO	78
7.2 ABSTRACT	78
7.3 INTRODUÇÃO	79
7.4 MATERIAL E MÉTODOS	80
7.4.1 Delineamento experimental.....	80
7.4.2 Administração das porfirinas de manganês (MnPs).....	81
7.4.3 Necropsia e coleta de material.....	82
7.4.4 Análise histomorfométrica da placenta.....	83
7.4.5 Imuno-histoquímica (IHQ).....	83
7.4.6 PCR em tempo real (qPCR)	84
7.4.7 Avaliação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutatona transferase (GST) e catalase	85
7.5 RESULTADOS	86
7.5.1 A administração de MnPs não compromete o desenvolvimento feto-placentário de ratas gestantes e aumenta o peso fetal.....	86
7.5.2 O tratamento com MnPs melhora o peso fetal e a morfologia placentária em ratas hipotireoideas.....	86
7.5.3 O tratamento com MnPs reduz a expressão de HIF1 α na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas.....	88
7.5.4 O tratamento com MnPs bloqueia o aumento decidual de 8-OHdG nas ratas hipotireoideas.....	90
7.5.5 O tratamento com MnPs aumenta a expressão proteica de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas e restaura a expressão gênica placentária de Gpx1	92
7.5.6 O tratamento com MnPs bloqueia o aumento de mediadores de estresse reticular na interface materno-fetal causado pelo hipotireoidismo	94
7.5.7 O tratamento com MnPs restaura a expressão decidual e/ou placentária de VEGF e IL-10 na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas.....	95
7.6 DISCUSSÃO	98
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICES	127

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão crítico para a nutrição e o desenvolvimento adequado do feto (CHANG *et al.*, 2020; REYNOLDS *et al.*, 2009). Falhas durante o desenvolvimento placentário contribuem não somente para a ocorrência de aborto, parto prematuro, restrição de crescimento ou morte fetal, como também representam um risco para a saúde da mãe, sendo que a gestação e o parto continuam sendo as principais causas de morte materna (BEZEMER *et al.*, 2020; BURTON; JAUNIAUX, 2017; REYNOLDS *et al.*, 2009; VONNAHME *et al.*, 2008). Vários fatores como subnutrição, infecções e distúrbios metabólicos como diabetes e hiperadrenocorticismismo podem causar disfunções placentárias e, secundariamente, a ocorrência de pré-eclâmpsia (DUFÉY *et al.*, 2014).

Pré-eclâmpsia é a principal causa de morbidade e mortalidade em mulheres gestantes e neonatos e está associada com restrição de crescimento intrauterino e comprometimento neurológico fetal grave (40 a 45% dos bebês). Embora afete 5 a 10% das gestações em todo o mundo e seja responsável por 10 a 15% das mortes maternas, em alguns países subdesenvolvidos ainda não possui tratamento efetivo ou prevenção (ABAD *et al.*, 2012; CINDROVA-DAVIES *et al.*, 2015; ROBERTS; HUBEL, 1999).

Apesar de grande parte dos casos de pré-eclâmpsia não apresentar causa definida, sua origem tem sido associada à remodelação trofoblástica deficiente das artérias espiraladas maternas que suprem a placenta (BURTON; JAUNIAUX, 2018; HUNG; BURTON, 2006; KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; REDMAN; SARGENT, 2009; REDMAN; SARGENT; STAFF, 2014). Falhas nesse processo resultam em um ambiente de hipóxia e/ou de isquemia e reoxigenação constante gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) e depleção das concentrações intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP). Como consequência, ocorre estresse placentário e liberação de mediadores inflamatórios na circulação materna que resultam em hipertensão, proteinúria e edema (BURTON; JAUNIAUX, 2018; REDMAN; SARGENT, 2009; REDMAN; SARGENT; STAFF, 2014; ROBERTS; REDMAN, 1993; YUNG *et al.*, 2008). Todas essas alterações são decorrentes principalmente de estresse oxidativo (AOUACHE *et al.*, 2018; HUNG; BURTON, 2006) e estresse de retículo endoplasmático (RE) (BURTON *et al.*, 2009; BURTON; YUNG, 2011; LIAN *et al.*, 2011; LORENZON-OJEA *et al.*, 2020; YUNG *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a proporção de EROs e de antioxidantes, no qual a produção de oxidantes supera a remoção dos mesmos (BARBOSA *et al.*, 2010). A maior parte das EROs encontrada no organismo é produzida nas mitocôndrias, onde há uma

espécie de “vazamento” de radicais livres de oxigênio pelo complexo III da cadeia respiratória, formando, principalmente, superóxidos, hidroxilas e peróxidos de hidrogênio (BURTON; JAUNIAUX, 2004; BURTON; YUNG, 2011). Fisiologicamente, mudanças nos níveis de oxigênio são necessárias durante todo o período gestacional para permitir o desenvolvimento adequado da placenta (SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). Assim, a produção de EROs ocorre normalmente durante o processo de placentação, sendo que seus efeitos deletérios são evitados pela ação de enzimas antioxidantes. Contudo, o perfil de expressão de mediadores pró-oxidantes e antioxidantes ao longo do desenvolvimento placentário não foi totalmente elucidado. Caso a produção de EROs seja excessiva e/ou prolongada e não ocorra a sua remoção adequada pelos fatores antioxidantes, danos severos em proteínas, lipídios e DNA podem ser observados, causando um estado de estresse oxidativo. Esse estresse pode causar a perda de função da organela, como também redução na produção de ATP, falha na sinalização celular e até a morte celular por apoptose, necrose ou piroptose (BURTON; JAUNIAUX, 2004; BURTON; YUNG, 2011; CHENG *et al.*, 2019),

Já o estresse de retículo endoplasmático (RE) é causado por perturbações na capacidade da organela em “enovelar” proteínas, resultando na ativação das vias de Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR, *Unfolded Protein Response*) e de degradação da proteína associada ao RE (ERAD, *ER-associated protein degradation*) (WALTER; RON, 2011; WANG; KAUFMAN, 2016; YUNG *et al.*, 2007), cujo perfil de expressão ao longo do desenvolvimento placentário também requer mais estudos. A UPR se trata de três vias de sinalização gradativas que têm por objetivo restaurar a homeostase da organela. Essas vias estão sob o controle de proteínas transmembrana (quinase do RE semelhante à proteína quinase do RNA (PERK); enzima 1 α requerente de inositol (IRE1 α) e fator de transcrição de ativação 6 (ATF6)), que são responsáveis por inibir a síntese de proteínas não essenciais, aumentar a capacidade de enovelar proteínas e estimular a biossíntese de fosfolipídios (VEERBEEK *et al.*, 2015). Enquanto isso, a via ERAD estimula simultaneamente a degradação de proteínas mal-enoveladas acumuladas. Se esses mecanismos não forem capazes de reduzir o estresse, ocorrerá morte celular por meio de apoptose (TABAS; RON, 2011; WANG; KAUFMAN, 2016; YUNG *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que o estresse oxidativo e o estresse de RE estão intrinsicamente ligados, particularmente pela proximidade entre as mitocôndrias, onde é produzida a maior parte das EROs, e o retículo endoplasmático. Assim, a redução dos níveis de ATP dentro da célula pode gerar não somente EROs, como também compromete a homeostase de Ca²⁺ e a função das enzimas responsáveis pelo enovelamento das proteínas (BURTON; YUNG, 2011;

VEERBEEK *et al.*, 2015). Pesquisas já mostraram que tanto o estresse oxidativo quanto as vias de resposta ao estresse de RE podem ser induzidas por infecção viral, hipóxia e privação de nutrientes (VEERBEEK *et al.*, 2015; WALTER; RON, 2011; YANG *et al.*, 2021), sendo que algumas doenças como neurodegeneração, diabetes, obesidade, câncer e hipotireoidismo apresentam estresse oxidativo e/ou o estresse de RE na sua patogênese (DUFY *et al.*, 2014; MANCINI *et al.*, 2016). Além disso, estudos mostraram que a redução sérica de triiodotironina (T3) ou tiroxina (T4) livre, o aumento de tireotrofina (TSH) e a presença de anticorpos contra tireoperoxidase (TPO) e tireoglobina (Tg) estão associados com a ocorrência de pré-eclâmpsia (KURLAK *et al.*, 2013; LARIJANI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2014), sugerindo uma relação causal entre hipotireoidismo e pré-eclâmpsia.

A prevalência de hipotireoidismo em mulheres durante a gestação é de 2,5 até 15%, dependendo da região geográfica (IDRIS *et al.*, 2005; ZHANG; DONG; SU, 2016), sendo que em animais também é considerada uma das principais endocrinopatias (CHOKSI *et al.*, 2003). Além da sua alta prevalência, sua incidência está associada ao atraso do início da puberdade (STYNE, 1991), anovulação (POPPE; GLINOER, 2003), cistos ovarianos, infertilidade, aumento da frequência de abortos espontâneos (LONGCOPE; C., 1991; THANGARATINAM *et al.*, 2011), além de originar neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (KRASSAS, 2000; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018).

Pesquisas realizadas por nosso grupo de pesquisa (SILVA *et al.*, 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015) demonstraram que ratas com hipotireoidismo gestacional apresentam placentas e fetos menores, sendo que essas alterações estavam associadas com uma redução da migração trofoblástica intrauterina e da expressão de metaloproteinases (MMP 2 e 9) e fatores angiogênicos (fator de crescimento placentário; PLGF) pela placenta, como também com um aumento da apoptose e redução da proliferação das células trofoblásticas. Silva, Ocarino, Serakides (2014) também demonstraram que o hipotireoidismo gestacional em ratas reduz a expressão de IL-10 e NOS2 na placenta. Estudos mostraram que a redução de IL-10 e NOS2 na interface materno-fetal promove estresse oxidativo placentário causando aborto, parto prematuro, natimortalidade e pré-eclâmpsia (HARMON *et al.*, 2015; KALKUNTE *et al.*, 2011; LAI; KALKUNTE; SHARMA, 2011; ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008).

Os hormônios tireoidianos são importantes reguladores do consumo de oxigênio e de antioxidantes no organismo (MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008), sendo que a hipofunção tireoidiana afeta a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias gerando EROs (CHAKRABARTI *et al.*, 2016), além de comprometer a atividade antioxidante e o

metabolismo lipídico (MANCINI *et al.*, 2016). Embora estudos tenham comprovado que o hipotireoidismo afeta o balanço oxidativo em diversos órgãos como pâncreas, cérebro, fígado e coração (MANCINI *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008; SAJADIAN *et al.*, 2016; ZHANG; DONG; SU, 2016), ainda não foi confirmado se o hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo na interface materno-fetal, como também não há informações sobre a ocorrência de estresse de RE. Na pré-eclâmpsia há aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas células trofoblásticas (GHOSH *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2012) e ratas gestantes com hipotireoidismo apresentam aumento da expressão de VEGF pela placenta no meio da gestação (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2015), sendo que o aumento da expressão de VEGF em células trofoblásticas envolve a ativação de IRE1 α , PERK e ATF6, proteínas envolvidas na UPR (GHOSH *et al.*, 2010), reforçando a hipótese de estresse reticular placentário causado pelo hipotireoidismo.

Pelo fato do hipotireoidismo e da pré-eclâmpsia, além de outras doenças como diabetes, obesidade e câncer, apresentarem na sua gênese um desbalanço no estado redox no interior da célula, pesquisas têm procurado ferramentas terapêuticas por meio da utilização de antioxidantes sintéticos ou naturais no intuito de restaurar o equilíbrio entre as EROs e os sistemas antioxidantes (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012). Nesse sentido, nos últimos anos, estudos tem demonstrado que porfirinas de manganês (MnPs) apresentam grande potencial terapêutico no controle do estresse oxidativo em modelos de acidente vascular cerebral, isquemia renal e radioproteção pelo fato de apresentarem alto poder antioxidante e mínima toxicidade, além da alta biodisponibilidade devido à sua lipofilicidade (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012). Essas porfirinas foram capazes de regular fatores de transcrição (HIF1 α e NF-KB) dependentes de redox e suprimir processos inflamatórios mediados por estresse oxidativo (BOTTINO *et al.*, 2004; GAUTER-FLECKENSTEIN *et al.*, 2010).

Dessa forma, caso o hipotireoidismo resulte em estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal de ratas, outra hipótese deste trabalho é que as MnPs podem impedir ou reduzir as alterações gestacionais observadas no hipotireoidismo materno. Se essa hipótese for comprovada, será de grande importância para o estabelecimento de ensaios clínicos em mulheres com pré-eclâmpsia e/ou hipotireoidismo materno (ABAD *et al.*, 2012; AOUACHE *et al.*, 2018; BURTON; JAUNIAUX, 2018; IDRIS *et al.*, 2005).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de mediadores de estresse oxidativo e da via UPR na interface materno-fetal de ratas em condições fisiológicas e no hipotireoidismo materno e o potencial terapêutico de MnPs na disfunção feto-placentária de ratas hipotireoideas.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar:

- Perfil de expressão gênica e proteica de HIF1 α , SOD1, CAT, GPx1, ATF6, PERK, GRP78 e CHOP na placenta de ratas aos 10, 12, 14, 16 e 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 1**);
- Expressão gênica e proteica de CAT, SOD1, SOD2, GPx1, NRF2 e HIF1 α na interface materno-fetal de ratas com hipotireoidismo materno aos 14 e 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 2**);
- Expressão gênica e proteica de PERK, XBP1, HO1, ATF6, ATF4, GRP78 e CHOP na interface materno-fetal de ratas com hipotireoidismo materno aos 14 e 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 2**);
- Atividade enzimática de SOD, Catalase e GST na placenta de ratas com hipotireoidismo materno aos 14 e 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 2**);
- Desenvolvimento fetal e placentário de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com MnIIT2EPyP e MnIIT5B3EPyP aos 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 3**);
- Expressão gênica e proteica de CAT, SOD1, GPx1, NRF2 e HIF1 α na placenta de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com MnIIT2EPyP e MnIIT5B3EPyP aos 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 3**);
- Expressão gênica e proteica de GRP78 e CHOP na placenta de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com MnIIT2EPyP e MnIIT5B3EPyP aos 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 3**);
- Atividade enzimática de SOD, Catalase e GST na placenta de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com MnIIT2EPyP e MnIIT5B3EPyP aos 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 3**);
- Expressão proteica de mediadores imunológicos (IL10, TNF α) e angiogênicos (VEGF) na placenta de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com MnIIT2EPyP e MnIIT5B3EPyP aos 18 dias de gestação (**CAPÍTULO 3**).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Interface materno-fetal

O estabelecimento de uma gestação e o desenvolvimento saudável do feto requer a formação adequada da interface materno-fetal, sendo que falhas nos processos de fertilização, decidualização e/ou placentação são críticos para a gestação. Nesse sentido, a interface materno-fetal atua na relação mãe-feto, modulando o metabolismo materno a favor do crescimento e desenvolvimento fetal, além de controlar a tolerância imunológica ao feto e protegê-lo contra diversas doenças e patógenos externos. Para desempenhar a sua função, a interface materno-fetal se organiza em uma porção materna – a decídua, e uma porção fetal – a placenta (CHANG *et al.*, 2020).

4.1.1 Decídua

A decídua é um tecido especializado do endométrio modificado cujo objetivo é permitir a implantação embrionária e manter a gestação, uma vez que desempenha funções imunológicas, antioxidantes, nutritivas e angiogênicas na interface materno-fetal (FULLERTON *et al.*, 2017; SILVA; SERAKIDES, 2016).

Em roedores (camundongos e ratos) a decídua é formada após a implantação do embrião, entre o 4º e 6º dia de gestação (LIU; WANG, 2015; PLAISIER, 2011), em que células estromais uterinas semelhantes a fibroblastos passam por um processo de diferenciação armazenam glicogênio, aumentam o volume e a capacidade de secretar diversos fatores de crescimento, sendo esse evento denominado de decidualização (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Em mulheres, a decidualização ocorre em um período conhecido como janela de implantação, que compreende o período pós-ovulação dentro do ciclo menstrual até o início da gestação. Caso haja fertilização e ocorra a implantação embrionária, a decidualização será controlada por diversos fatores de crescimento e mediadores hormonais, resultante do aumento sérico dos níveis plasmáticos de progesterona (P₄) e estradiol (E₂).

A decidualização ou reação decidual em humanos é caracterizada por extensa proliferação, diferenciação e vascularização uterina, na qual células mesenquimais alongadas semelhantes a fibroblastos se diferenciam em células epitelioides denominadas de células deciduais (GELLERSEN; BROSENS, 2014). Essas células possuem capacidade secretora, produzindo fatores como a proteína-1 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFBP1) e a prolactina (PRL), marcadores característicos do processo de decidualização (APLIN *et al.*, 2020; CHAKRABORTY *et al.*, 2011; GELLERSEN;

BROSENS, 2014; JIA; LI, 2020; SMITH *et al.*, 2009). A decídua é reconhecida também por sua alta vascularização e por coordenar a angiogênese na interface materno-fetal (REYNOLDS *et al.*, 2009), sendo essa angiogênese regulada principalmente pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), angiopoietinas (ANGs) e o fator de crescimento placentário (PIGF). Essa modulação da angiogênese realizada por esses mediadores é dependente de P_4 e E_2 (PLAISIER, 2011; SOUZA *et al.*, 2017, 2020).

No processo de decidualização é necessário o estabelecimento de um ambiente inflamatório na interface materno-fetal e o desenvolvimento de tolerância imune materna, para que ocorra o processo de invasão trofoblástica no endométrio e, com isso, a implantação embrionária. Falhas durante esse processo são incriminadas como as principais causas de perda gestacional recorrente, uma vez que modulação imunológica inadequada na decídua pode levar à rejeição do conceito (LUCAS *et al.*, 2020; SHARMA, 2014; SILVA; SERAKIDES, 2016). Todo esse processo de invasão trofoblástica e modulação da resposta imune na interface materno-fetal é regulado de forma temporal e espacial por fatores autócrinos e parácrinos derivados dos trofoblasto e/ou das células deciduais (APLIN *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2016).

As células trofoblásticas invasoras ou extravilosas (EVTs) compreendem o trofoblasto intersticial, que invade o estroma decidual, e o trofoblasto endovascular, que promove a invasão e remodelamento das artérias espiraladas uterinas (SILVA; SERAKIDES, 2016). Essas EVTs são responsáveis pela secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente MMP 2 e MMP 9, que degradam a matriz extracelular para permitir a invasão e migração trofoblástica intrauterina. A decídua, ao mesmo tempo, controla esse processo de invasão trofoblástica ao produzir os inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (TIMPs). Os TIMPs clivam as MMPs e evitam a invasão exacerbada do endométrio pelo trofoblasto invasivo (LEE *et al.*, 2019; SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016). Falhas nesse controle resultam em alterações placentárias graves como a placenta creta, na qual o trofoblasto pode atingir até o perimétrio resultando em sangramento intenso e problemas no processo do parto (JAUNIAUX; BURTON, 2018; ZHU; PANG; YU, 2012). Além dessas alterações, falhas na decidualização também podem resultar em aborto precoce e disfunções na placentação, causando pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino (DUNK *et al.*, 2019).

Em mulheres, as células EVT também realizam a invasão das glândulas uterinas no início da decidualização (trofoblastos endoglandulares), promovendo a nutrição histotrófica do embrião no início da gestação, uma das principais funções da decídua. Essa função de

nutrição histotrófica ficou mais evidente também depois de ser verificado que as células EVTs endovasculares, no início da remodelação das artérias espirais, obstruem esses vasos sanguíneos, restringindo o fluxo de sangue para a placenta. Somente após o desenvolvimento do embrião, esses plugues celulares formados pelas células EVTs são rompidos e o sangue oxigenado e rico em nutrientes atinge a placenta (JAFTE; JAUNIAUX; HUSTIN, 1997; MOSER *et al.*, 2015, 2016; WANG; ZHAO, 2010). A partir desse momento e com a formação da placenta, a nutrição do embrião passa a ser hemotrófica (BURTON; CINDROVA-DAVIES; TURCO, 2020; JONES; CHOUDHURY; APLIN, 2015; MOSER *et al.*, 2015).

4.1.2 Placentação

O processo de placentação é outro evento importante para o estabelecimento da interface materno-fetal. A placenta é o órgão responsável pelo desenvolvimento e nutrição do feto, além de assumir diversas outras funções como imunorregulação e produção hormonal (FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; SILVA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012).

Existem três tipos gerais de placenta que são classificadas quanto à formação da barreira placentária (CARTER; ENDERS, 2016; LEISER; KAUFMANN, 1994). Humanos, roedores e primatas não-humanos possuem uma placenta hemocorial, que é mais invasiva, já que há contato direto entre trofoblasto e o sangue materno. É importante destacar que as placentas hemocoriais são subdivididas quanto à quantidade de camadas de células trofoblásticas que separam os vasos fetais do sangue materno, sendo classificadas como hemotricoriais (três camadas), hemodicoriais (duas camadas) ou hemomonocoriais (uma camada) (LEISER; KAUFMANN, 1994). Assim, enquanto em humanos a placenta é hemomonocorial, na rata e nos camundongos a placenta é classificada como hemotricorial. Além disso, outros tipos de placentas menos invasivas são observados em outras espécies, como a endoteliocorial que ocorre principalmente em carnívoros e a sinepteliocorial em ruminantes (ENDERS, 1965; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014; FURUKAWA; TSUJI; SUGIYAMA, 2019; LEISER; KAUFMANN, 1994; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2015).

O desenvolvimento da placenta depende de mecanismos de diferenciação, migração e invasão das células trofoblásticas, as quais possuem a capacidade de reconhecer, modificar e modular a função das células uterinas (ZHANG *et al.*, 2016a). A placenta hemocorial de ratas, foco deste estudo, é formada por volta do 12º dia de gestação, possui formato discoide e se divide morfológicamente em duas camadas, que se dispõem no sentido da mãe para o feto:

zona juncional, formada pela camada de células gigantes e espongiotrofoblasto; e zona do labirinto, além da placa coriônica (BURDON *et al.*, 2007; SILVA; SERAKIDES, 2016).

As células gigantes trofoblásticas e o trofoblasto invasor que se originam da zona juncional estão diretamente envolvidos no remodelamento da decídua, na imunorregulação e na produção de hormônios da família da PRL (FARIA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2012). O espongiotrofoblasto, presente na zona juncional, modula a proliferação e diferenciação do trofoblasto invasor, a síntese de hormônios como P₄ e PRL, além da formação e diferenciação das células de glicogênio. As células de glicogênio apresentam não somente função nutritiva como reserva energética, mas também auxiliam no remodelamento das artérias espiraladas uterinas e imunomodulação da interface materno-fetal. Já a zona do labirinto é o local onde ocorrem as trocas gasosas, de nutrientes e resíduos entre a mãe e o feto (BURDON *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2012).

Humanos e ratos possuem placenta hemocorial com algumas semelhanças morfofisiológicas. Dentre as semelhanças, uma das características é a invasão e o remodelamento das artérias espiraladas, que em ratos é profunda assim como observado em humanos (PIJNENBORG; VERCRUYSSSE; HANSSENS, 2006; SOARES *et al.*, 2012). No entanto, a placenta de roedores possui o labirinto placentário como região de troca materno-fetal, enquanto em humanos são observadas as vilosidades coriônicas (SILVA; SERAKIDES, 2016).

O trofoblasto endovascular e intersticial presentes no endométrio decidualizado são as principais células envolvidas na remodelação das artérias espiraladas uterinas, por apresentarem características migratórias e invasivas, além de influenciarem o comportamento de outros tipos celulares na interface materno-fetal (SILVA; SERAKIDES, 2016). A remodelação mais invasiva e profunda das artérias espiraladas uterinas aumenta sua flacidez e distensão, pois seus constituintes estruturais como o músculo liso e a lâmina elástica que envolvem essas artérias são removidos, facilitando assim o fluxo sanguíneo adequado para o feto em crescimento (PIJNENBORG; VERCRUYSSSE; HANSSENS, 2006; SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES *et al.*, 2014).

As células *natural killer* uterinas (uNKs), presentes no endométrio decidualizado, são também fundamentais para o processo de placentação. Existem diversos estudos que atribuem diferentes funções a essas células no desenvolvimento placentário, principalmente na placentação hemocorial. Alguns autores sugerem que as células uNKs atuam na interface materno-fetal induzindo a migração e invasão das células trofoblásticas e o remodelamento das artérias espiraladas no início da gestação (CHAKRABORTY *et al.*, 2011; FAAS; DE

VOS, 2017; MOFFETT-KING, 2002; SOARES *et al.*, 2012), pois com a morte dessas células ocorre a liberação dos seus grânulos que degradam a matriz extracelular e as células musculares lisas da parede vascular (CHAKRABORTY *et al.*, 2011; SILVA; SERAKIDES, 2016). As células uNKs também modulam e restringem o processo de invasão trofoblástica prematura e a reestruturação das artérias espiraladas uterinas, promovendo assim uma proteção materna contra disfunções placentárias decorrentes de invasão trofoblástica excessiva (RENAUD *et al.*, 2017).

Tanto em ratas quanto em mulheres, falhas na migração trofoblástica e deficiência na remodelação das artérias espiraladas uterinas são apontadas como as principais causas da pré-eclâmpsia e de outras disfunções gestacionais, como parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino e morte fetal, que podem afetar não somente a saúde materna, como também a saúde do recém-nascido na vida pós-natal (SILVA; SERAKIDES, 2016; SOARES; VARBERG; IQBAL, 2018).

4.2 Hipotireoidismo e disfunção placentária

Os hormônios tireoidianos (HTs) modulam diversos processos fisiológicos no organismo como o crescimento e desenvolvimento de órgãos, metabolismo energético, reprodução, defesa contra radicais livres, entre outros. Suas ações ocorrem desde o desenvolvimento fetal, sendo os HTs inicialmente fornecidos pela mãe e depois produzidos pelo próprio feto, até a vida adulta (CHENG *et al.*, 2015; CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010; CROSS, 2005; HULBERT, 2000; MANCINI *et al.*, 2016).

Os principais HTs são a T3 e a T4. A T4 é a principal forma encontrada no sangue e precursora da T3, a forma biologicamente ativa. Na reprodução, os HTs possuem não somente ação central, influenciando a liberação das gonadotrofinas (FONSECA *et al.*, 2013; LARSEN, 1982), como também agem sobre os folículos ovarianos, os corpos lúteos, o útero e a placenta influenciando o seu desenvolvimento e função. Sua ação ocorre em conjunto com outros hormônios e fatores de crescimento, como E₂, PRL e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que influenciam a atividade e função dos HTs (CHEN *et al.*, 2013; CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010; SILVA *et al.*, 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2018).

Em humanos e roedores, os mecanismos que regulam os HTs são os mesmos. O eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) é regulado por sistemas de *feedbacks* negativos e positivos, sendo que o hormônio liberador de tireotropina (TRH), secretado pelo hipotálamo, regula a secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) pela hipófise, que atua na

glândula tireoide promovendo a síntese e secreção de T3 e T4. Estes, por sua vez, limitam a liberação hipotalâmica e hipofisária de TRH e TSH, respectivamente, para manter seus níveis plasmáticos dentro da normalidade (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; ZIEGELMÜLLER *et al.*, 2015).

Alterações no eixo HHT podem desencadear disfunções tireoidianas como o hipo e o hipertireoidismo, tendo o hipotireoidismo maior prevalência. A hipofunção tireoidiana é uma das principais endocrinopatias que afetam mulheres em idade reprodutiva (1 a 3%), levando a quadros de infertilidade, pré-eclâmpsia, aborto, parto prematuro, redução no peso fetal e placentário, natimortalidade e cretinismo tanto em humanos quanto em animais (BUDENHOFER *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; THANGARATINAM *et al.*, 2011; ZIEGELMÜLLER *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que o hipotireoidismo em ratas afeta a decidualização, reduz a migração trofoblástica intrauterina com redução da produção de MMP 2 e 9, além de comprometer o desenvolvimento placentário e a angiogênese na interface materno-fetal. Ratas com hipotireoidismo materno apresentam aumento da apoptose e redução da proliferação de células trofoblásticas na camada juncional e labiríntica, como também redução de mediadores angiogênicos como o fator de crescimento placentário (PIGF) (CHEN; CHEN; LIN, 2015; SILVA *et al.*, 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2015; SOUZA *et al.*, 2017).

Na placenta de ratas hipotireoideas foi demonstrada também redução da expressão de mediadores anti-inflamatórios como interleucina 10 (IL-10) e óxido nítrico sintetase-2 (NOS2) (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; THANGARATINAM *et al.*, 2011), enquanto na decídua foi observada redução de NOS2 e da população de células uNKs (SOUZA *et al.*, 2020). Como a interface materno-fetal apresenta um ambiente anti-inflamatório na maior parte da gestação, com exceção do período de implantação e parto, isso permite uma tolerância imunológica adequada ao feto durante o seu desenvolvimento. Desse modo, o comprometimento desse *status* imunológico da interface materno-fetal, como observado no hipotireoidismo, pode comprometer o desenvolvimento fetal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014). Além disso, redução de IL-10 e NOS2, da migração trofoblástica intrauterina e da angiogênese têm sido associados a estresse oxidativo em algumas disfunções gestacionais, como aborto, parto prematuro, natimortalidade e pré-eclâmpsia (BURTON; JAUNIAUX, 2018; HARMON *et al.*, 2015; KALKUNTE *et al.*, 2011; ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; SILVA; SERAKIDES, 2016).

Os HTs são importantes reguladores do consumo de oxigênio e de antioxidantes no organismo (MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008), sendo que a hipofunção tireoidiana

afeta a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias gerando EROs (CHAKRABARTI *et al.*, 2016), além de comprometer a atividade antioxidante e o metabolismo lipídico. Embora estudos tenham comprovado que o hipotireoidismo afeta o balanço oxidativo em diversos órgãos como pâncreas, cérebro, fígado e coração (MANCINI *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008; SAJADIAN *et al.*, 2016; ZHANG; DONG; SU, 2016), ainda não foi confirmado se o hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo (EO) na interface materno-fetal, que poderia ser a causa das alterações placentárias observadas em mulheres e ratas com hipotireoidismo. Vale salientar que, o EO tem sido incriminado como a principal causa das alterações gestacionais observadas em mulheres com pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, aborto recorrente e parto prematuro (AOUACHE *et al.*, 2018; HANSSON; NÄÄV; ERLANDSSON, 2015).

4.3 Estresse placentário

Mudanças nos níveis de oxigênio na interface materno-fetal ocorrem durante todo o período gestacional, sendo que um ambiente de hipóxia fisiológica em diferentes estágios gestacionais é necessário para os processos de placentação, angiogênese e hematopoiese (SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). Contudo, quando ocorrem disfunções placentárias que implicam em má perfusão sanguínea, como falhas na invasão trofoblástica e no remodelamento das artérias espiraladas uterinas, a hipóxia ocorre de forma exacerbada e resulta em EO. Esse EO ocorre pela alta produção de EROs, que é prejudicial para o desenvolvimento e função da interface materno-fetal (BURTON; YUNG, 2011).

O EO pode ser intensificado não somente por uma redução da expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes, como também pela redução da atividade das MMPs 2 e 9 causada pelos baixos níveis de O₂, que compromete mais ainda o processo de invasão pelas células trofoblásticas (ONOGI *et al.*, 2011; SCHOOTS *et al.*, 2018). Contudo, a redução dos níveis de O₂ e, consequentemente, de ATP, pode gerar não somente EROs na interface materno-fetal, como também compromete a homeostase de Ca²⁺ e a função das enzimas responsáveis pelo enovelamento das proteínas dentro do retículo endoplasmático (RE), podendo causar o estresse de RE (ERE)(BURTON; YUNG, 2011; VEERBEEK *et al.*, 2015). Assim, hoje sabe-se que tanto o EO quanto o ERE estão associados com a ocorrência de doenças gestacionais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e aborto (BURTON; JAUNIAUX, 2011; BURTON; YUNG, 2011; LIAN *et al.*, 2011; YUNG *et al.*, 2007).

4.3.1 Estresse oxidativo

O EO tem sido estudado e caracterizado de diversas formas nos últimos anos, uma vez

que está implicado na patogênese de diversas doenças, entre elas a pré-eclâmpsia, diabetes mellitus gestacional e outras patologias gestacionais. O EO é definido como um desequilíbrio metabólico na produção de oxidantes e sua remoção pelos antioxidantes, resultando em elevada concentração de EROs. A mitocôndria é a principal organela envolvida (MAILLOUX, 2020), uma vez que é através dela que ocorre um “vazamento” de radicais livres de oxigênio pelos complexos I e III da cadeia respiratória, formando, principalmente, superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilas (OH) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) (BURTON; JAUNIAUX, 2004, 2011).

Contudo, fisiologicamente, diferentes tipos de EROs também estão envolvidos em diversos processos metabólicos. Como exemplo, baixas concentrações de H_2O_2 participam na diferenciação e proliferação celular, de modo que estudos já demonstram que as EROs são essenciais para a sobrevivência celular e sinalização adaptativa (ALFADDA; SALLAM, 2012; JONES; CHOUDHURY; APLIN, 2015; MAILLOUX, 2020; SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017). Entretanto, um estado prolongado de estresse oxidativo danifica as células por causar danos severos às proteínas, lipídios e DNA, cujas consequências podem ser desde a perda de função de organelas, como também redução na produção de ATP, falha na sinalização celular e até a morte celular por apoptose, necrose ou piroptose (BURTON; JAUNIAUX, 2004; CHENG *et al.*, 2019).

Altos níveis de EROs promovem ativação do fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1), principal marcador de hipóxia no ambiente celular (DUNWOODIE, 2009; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). O HIF-1 promove de forma bilateral a regulação dos níveis de EROs na célula, por meio da indução de angiogênese através da expressão de VEGF (ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, o HIF-1 exerce grande influência no processo de placentação, uma vez que influencia o recrutamento, diferenciação e proliferação das células uNKs na decídua, como também a maturação da zona juncional da placenta e a migração e diferenciação das células de glicogênio. A redução do número de células uNKs promove um ambiente de hipóxia decidual, que é sinalizado pelo aumento de HIF-1. Ratas com redução de células uNKs apresentam aumento da zona juncional, sendo que o mesmo foi observado em ratas gestantes expostas a um ambiente de baixo teor de oxigênio no início da gestação (CHAKRABARTI *et al.*, 2016; KENCHEGOWDA *et al.*, 2017; SOARES *et al.*, 2014).

Com o excesso de EROs, mecanismos de defesa são acionados para controlar ou minimizar os danos por eles causados. Entre essas vias antioxidantes estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Algumas dessas enzimas dependem de micronutrientes para funcionarem adequadamente, como a glutathione

peroxidase, que requer o selênio para regular a peroxidação de lipídios e de hidrogênio. Por esse motivo, o estresse oxidativo também pode ser desencadeado por dieta desbalanceada ou subnutrição (MISTRY; WILLIAMS, 2011; SHENG *et al.*, 2014).

A enzima SOD é responsável pela conversão do superóxido em H_2O_2 . Depois, através da ação das enzimas CAT ou GPx, o H_2O_2 pode ser transformado em água. A SOD é encontrada em três formas biológicas: SOD1 ou manganês SOD (MnSOD), expressa em mitocôndrias, SOD2 ou cobre-zinco SOD (CuZnSOD), expressa no citoplasma, e SOD3, também denominada CuZnSOD, encontrada no meio extracelular (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; MILLER, 2012).

A catalase é um tetrâmero contendo heme, comumente encontrada na maioria dos organismos aeróbios. É muito eficiente em degradar o H_2O_2 em moléculas de água e oxigênio por meio da reação de Fenton, evitando a formação de EROs. Há grande expressão de catalase nos tecidos hepático, renal e pulmonar, principalmente no interior das mitocôndrias e, em menor extensão, nos peroxissomos (RINDLER *et al.*, 2013; UNSAL *et al.*, 2020).

A glutathione também é responsável pela degradação de H_2O_2 , exercendo suas funções antioxidantes através de reações enzimáticas e não enzimáticas. É classificada em glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S transferase (GST). Já foram identificados oito tipos de GPx, sendo a GPx1 a mais importante no combate ao EO. A GPx1 é intracelular e encontrada em diferentes compartimentos celulares, como no citosol e nas mitocôndrias. A GPx1 em mamíferos é geralmente selênio- dependente, de modo que baixos níveis de selênio reduzem os níveis de GPx1. A Gpx2, diferente da Gpx1, é mais restrita e expressa principalmente no sistema gastrointestinal dos mamíferos. A GPx3 é extracelular e importante no combate ao EO no plasma e interstício (JIAO *et al.*, 2017; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; UNSAL *et al.*, 2020).

A expressão dessas enzimas antioxidantes depende também da ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2). O NRF2, junto com a proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1), atua na defesa antioxidante ao regular positivamente as enzimas SOD, CAT e GPx, como também a expressão de VEGF. Além disso, o NRF2 é capaz de modular processos inflamatórios ao regular negativamente a expressão do fator nuclear- kappa B (NF-kB). A redução de NRF2 está associada a ocorrência de EO e, conseqüentemente, de inflamação, por meio da ativação do NF-kB (ARMISTEAD *et al.*, 2020; FRANCISQUETI-FERRON *et al.*, 2019; LOBODA *et al.*, 2016; SHARMA *et al.*, 2021).

4.3.2 Estresse de retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma importante organela celular responsável pelo dobramento de proteínas e encaminhamento ao complexo de Golgi via vesículas secretórias. Quando ocorre lesão celular provocada por estresse oxidativo, processos inflamatórios, infecções virais, privação de nutrientes e/ou deficiências nos níveis de cálcio, proteínas mal enoveladas começam a se acumular no RE. Por causa disso, uma série de vias de sinalização são ativadas, por meio da via de Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR, *Unfolded Protein Response*), para evitar o acúmulo de proteínas mal enoveladas. A ativação dessas vias compreende o estresse de retículo endoplasmático (ERE), cujo objetivo principal é restaurar a homeostase celular. Caso o acúmulo dessas proteínas seja excessivo e/ou se mantenha por tempo prolongado, o ERE pode resultar em inflamação e morte celular (WANG; KAUFMAN, 2016). No entanto, vale ressaltar que a ativação do ERE também está implicada em eventos fisiológicos na interface materno-fetal, como na migração e invasão trofoblástica e na angiogênese (GUZEL *et al.*, 2017; SCHOOTS *et al.*, 2018).

A UPR está sob o controle de três proteínas transmembrana: quinase do RE semelhante à proteína quinase do RNA (PERK), enzima 1 α requerente de inositol (IRE1 α) e fator 6 de ativação transcricional (ATF6), que são responsáveis por inibir a síntese de proteínas não essenciais e aumentar a capacidade de enovelar e estimular a biossíntese de fosfolípidios (VEERBEEK *et al.*, 2015). Sob condições basais, a chaperona BiP, também chamada de GRP78, mantém essas proteínas transmembranas em estado inativo ao se ligar aos seus respectivos sensores no domínio luminal do RE. Com o aumento de proteínas mal enoveladas no RE, as BiPs se desprendem dos sensores da UPR e se ligam às proteínas mal enoveladas, ocorrendo ativação de PERK, IRE1 α e ATF6, uma vez que essas proteínas não estão mais ligadas às BiPs. A ligação das BiPs às proteínas mal enoveladas vai auxiliar no desdobramento das mesmas ou encaminhá-la para a via de degradação de proteínas associada ao RE (ERAD) (HETZ; PAPA, 2018; WANG; KAUFMAN, 2016). A via ERAD promove a degradação de proteínas mal enoveladas via sistema ubiquitina-proteassoma ou autofagia (CHAUDHARI *et al.*, 2014; SMITH; PLOEGH; WEISSMAN, 2011).

Após dissociação da BiP, a PERK sofre dimerização e autofosforilação e é responsável por ativar o fator 2 alfa de iniciação eucariótica (eIF2 α), que através de fosforilação bloqueia a atividade de eIF2B, regulando negativamente a síntese proteica. Além disso, promove a translação do fator 4 de ativação transcricional (ATF4), que é responsável por ativar a proteína homóloga pró-apoptótica C/EBP (CHOP) (RODRIGUEZ; ROJAS-RIVERA; HETZ, 2011; RON; HARDING, 2012). A ativação de ATF4 também pode ocorrer, via PERK-NRF2

(LEE *et al.*, 2019). A via IRE1 α é acionada e sofre autofosforilação em casos de ERE de curto prazo. Após ser ativada, IRE1 α atua sobre a proteína 1 de ligação a caixa X (XBP1; *X-box binding protein 1*), gerando XBP1s. A XBP1s ativa genes envolvidos na degradação e/ou maturação das proteínas mal enoveladas por meio da expressão de chaperonas ou da ERAD, biossíntese de fosfolipídios, além de inibir CHOP, promovendo a sobrevivência celular (HUANG; XING; LIU, 2019; LI *et al.*, 2020). O ATF6 é um fator de transcrição transmembrana que durante o ERE transloca para o aparelho de Golgi e sofre um processo de clivagem e ativação. Após sua ativação, ATF6-N transloca para o núcleo e induz a expressão de genes responsáveis pelo enovelamento de proteínas e ativação da via ERAD, além da ativação de CHOP via XBP1 (ALMANZA *et al.*, 2019).

A ativação das vias UPR e ERAD propiciam o restabelecimento da homeostase celular diminuindo a carga de estresse no RE. Se esses mecanismos não forem capazes de reduzir o estresse e o mesmo se tornar excessivo, o ERE é mantido e ocorre ativação de CHOP, resultando em morte celular por meio de apoptose (BURTON; YUNG, 2011; MANCINI *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que o ERE e o EO estão intrinsicamente ligados, particularmente pela proximidade da mitocôndria, onde é produzida a maior parte das EROs, e o retículo endoplasmático. Assim, uma redução dos níveis de ATP dentro da célula pode gerar não somente EROs, como também compromete a homeostase de Ca²⁺ e a função das enzimas responsáveis pelo enovelamento das proteínas (BURTON; YUNG, 2011; VEERBEEK *et al.*, 2015). Além disso, tanto o ERE como o EO estão intimamente associados com a cascata de inflamação através da ativação do NF- κ B. Esta ativação ocorre principalmente pela via IRE1 α , que degrada o inibidor nuclear do fator kappa B (I κ B α), inibidor do NF- κ B. Além disso, a via PERK também pode atuar na ativação do NF- κ B (SCHMITZ *et al.*, 2018).

Pesquisas já mostraram que tanto o EO quanto o ERE podem ser induzidos por infecção viral, hipóxia e privação de nutrientes (VEERBEEK *et al.*, 2015), sendo que algumas doenças como disfunções neurodegenerativas, diabetes, obesidade, câncer, restrição de crescimento fetal, pré-eclâmpsia e aborto apresentam o EO e o ERE na sua patogênese (BURTON; YUNG, 2011; DUFEY *et al.*, 2014; GUZEL *et al.*, 2017; LORENZON-OJEA *et al.*, 2020; MANCINI *et al.*, 2016). Desse modo, pelo fato de estarem envolvidos em importantes patologias que comprometem o desenvolvimento placentário e fetal, podendo comprometer a saúde pós-natal, o EO e o ERE têm sido o foco de pesquisas que avaliam alvos terapêuticos para doenças gestacionais (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012; BURTON;

JAUNIAUX, 2011). Assim, na tentativa de encontrar antioxidantes sintéticos ou naturais que restaurem o equilíbrio entre as EROs e os sistemas antioxidantes, estudos pré-clínicos e clínicos já foram realizados usando suplementação com vitamina E e selênio, cálcio, magnésio, vitamina C e óleo de peixe na prevenção e/ou tratamento de doenças gestacionais que cursam com estresse placentário, como a pré-eclâmpsia. Entretanto, a maioria desses estudos mostrou resultados pouco significativos no controle da síndrome (CARDENAS; GHOSH, 2013; FIGUEROA-MÉNDEZ; RIVAS-ARANCIBIA, 2015; HE *et al.*, 2017; M. RESLAN; A. KHALIL, 2010; REITER *et al.*, 2016). Nesse sentido, estudos têm demonstrado que porfirinas de manganês (MnPs), que são miméticas da enzima SOD, apresentam grande potencial terapêutico no controle do EO em modelos de acidente vascular cerebral, isquemia renal e radioproteção (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012). No entanto, ainda não existem estudos avaliando o potencial terapêutico de MnPs em disfunções gestacionais.

4.4 Porfirinas de manganês (MnPs)

As MnPs têm despertado grande interesse na comunidade científica devido ao seu alto poder antioxidante e mínima toxicidade, além da alta biodisponibilidade devido à sua lipofilicidade (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012, 2014; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009). As MnPs são metaloporfirinas, sendo que seu anel porfirínico tem a capacidade de ser alterado. Como exemplos temos as MnTE-2-PyP 5+, MnTM-2-PyP 5+, MnTnBu-2-PyP 5+, MnTnHex-2-PyP 5+ e MnTnBuOE-2-PyP 5+ (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012, 2014; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009; OLSON *et al.*, 2020; SHRISHRIMAL *et al.*, 2020).

Estudos já comprovaram que as MnPs protegem contra o estresse oxidativo em diferentes modelos experimentais de doença, como acidente vascular cerebral, câncer, diabetes, isquemia e radioterapia (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009; GAUTER-FLECKENSTEIN *et al.*, 2010; OBERLEY-DEEGAN *et al.*, 2012; SABA *et al.*, 2007; SHRISHRIMAL *et al.*, 2020). As MnPs possuem atividade anti e pró-oxidativa e removem tanto o superóxido (O₂⁻) quanto o peroxinitrito (ONOO⁻), que são danosos para células e tecidos. A ação pró-oxidativa das MnPs são baseadas na sua capacidade de doar ou aceitar elétrons de forma igualmente efetiva. Dessa forma, as MnPs podem atuar no equilíbrio redox entre as EROS e os antioxidantes, removendo as EROS ou até mesmo aumentando a produção de EROs levando a apoptose ou necrose celular (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012; BATINIĆ-HABERLE; RAJIĆ; BENOVA, 2011). Além disso, elas possuem a capacidade de regular fatores de transcrição dependentes de redox, como HIF1 α , Proteína ativadora 1 (AP-1), NRF2 e NF-KB, suprimindo processos

inflamatórios mediados pelo estresse oxidativo (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2014; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009; RATCLIFFE *et al.*, 2017; SHRISHRIMAL *et al.*, 2020). Gauter-Fleckenstein *et al.* (2010) também demonstraram que se as MnPs estiverem ausentes no momento do estresse oxidativo, mas forem administradas horas ou semanas depois, notáveis efeitos protetores ainda podem ser alcançados. Além da atividade antioxidante semelhante a SOD, as MnPs também podem oxidar o sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o dissulfeto de hidrogênio (H_2S_2), atuando como citoprotetores diretos (OLSON *et al.*, 2020).

Assim, pensando nesse alto poder antioxidante e citoprotetor das MnPs, uma hipótese é que elas possam ser um bom alvo terapêutico para disfunções gestacionais que cursam com EO e ERE placentário.

5 CAPÍTULO 1

EXPRESSÃO ESPAÇO TEMPORAL DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF1A), DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E MEDIADORES DE PROTEÍNAS MAL-ENOVELADAS (UPR) NA PLACENTA DE RATAS NA SEGUNDA METADE DA GESTAÇÃO

Spacetemporal expression of hypoxia-induced factor (HIF1 α), antioxidant enzymes and unfolded protein response (UPR) mediators in the placenta of rats in the second half of pregnancy

5.1 RESUMO

Durante a gestação, processos celulares como proliferação, diferenciação, migração, invasão e apoptose de células trofoblásticas são necessários para o desenvolvimento adequado da placenta. Esses processos estão sob a influência de hipóxia no início da gestação, como também da modulação adequada de estresse oxidativo e da via de resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR). No entanto, o perfil dos mediadores envolvidos nesses processos ao longo do desenvolvimento placentário carece de estudos. Assim, o objetivo foi avaliar o perfil de expressão do fator induzido por hipóxia (HIF1 α), de enzimas antioxidantes e mediadores da UPR na placenta de ratas durante a segunda metade da gestação. Ratas Wistar foram utilizadas e no 10°, 12°, 14°, 16° e 18° dia de gestação (DG) foi avaliada a expressão placentária de HIF1 α , SOD1, GPX1/2, Catalase, ATF6, PERK, GRP78 e CHOP por imunohistoquímica e qPCR. Maior imunomarcção de HIF1 α foi observada no 16° e 18° DG, enquanto SOD1 e CAT apresentaram maior imunomarcção aos 14 e 18 DG. GPx1/2, GRP78 e CHOP apresentaram maior imunomarcção aos 18 DG. Em relação a expressão gênica, *Hif1 α* e *Sod1* apresentaram maior expressão de mRNA no 12° e 16° DG. Em relação a *GPx1*, foi observada maior expressão no 10° e 16° dia de gestação, enquanto *Cat*, *Perk* e *Grp78* apresentaram maior expressão gênica no 14° DG, diferente de *Atf6* que teve maior expressão no 12° DG. *Chop*, por outro lado, manteve expressão elevada do 12° até o 18° dia de gestação, sugerindo ativação do estresse de retículo endoplasmático ao final da gestação. Conclui-se que a expressão placentária de enzimas antioxidantes e mediadores da UPR é influenciada pela idade gestacional, com maior expressão nos períodos de maior expressão de HIF1 α e ao final da gestação.

Palavras-chave: estresse oxidativo; placentação; estresse reticular; antioxidantes; rata.

5.2 ABSTRACT

During pregnancy, cellular processes such as proliferation, differentiation, migration, invasion, and apoptosis of trophoblastic cells are necessary for adequate placental development. These processes are influenced by hypoxia at the start of pregnancy, as well as adequate modulation of oxidative stress and the unfolded protein response (UPR) pathway. However, there is a lack of studies on the profile of mediators involved in these processes throughout placental development. Thus, the aim was to evaluate the expression profile of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α), antioxidant enzymes, and UPR mediators in the placentas of rats during the second half of pregnancy. Wistar rats were used and the placental expression of HIF1 α , SOD1, GPX1/2, Catalase, ATF6, PERK, GRP78, and CHOP was evaluated on the 10th, 12th, 14th, and 16th day of pregnancy (DP). Increased immunostaining of HIF1 α was observed on the 16th and 18th DP and increased immunostaining of SOD1 and CAT was observed on the 14th and 18th DP. Immunostaining of GPx1/2, GRP78, and CHOP was greater on the 18th DP. About gene expression, *Hif1 α* and *Sod1* showed increased mRNA expression on the 12th and 16th DP. About *GPx1*, increased expression was observed on the 10th and 16th DP, while *Cat*, *Perk*, and *Grp78* showed greater gene expression on the 14th DP, unlike *Atf6*, which showed greater expression on the 12th DP. In contrast, *Chop* maintained increased expression from the 12th to the 18th DP, suggesting activation of endoplasmic reticulum stress at the end of the pregnancy. It is concluded that the placental expression of antioxidant enzymes and UPR mediators is influenced by gestational age, with greater expression in periods of greater HIF1 α expression and at the end of the pregnancy.

Keywords: oxidative stress, placentation, reticular stress, antioxidants, rat.

5.3 INTRODUÇÃO

A placenta é o órgão responsável pela manutenção da gestação, uma vez que fornece nutrientes e oxigênio para o feto possibilitando seu desenvolvimento adequado (BURTON; FOWDEN, 2015; CHANG *et al.*, 2020; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). O desenvolvimento placentário depende de uma série de eventos como proliferação, diferenciação e apoptose de células trofoblásticas (HAYDER *et al.*, 2018; SILVA; SERAKIDES, 2016). Esses processos apresentam alto metabolismo celular, consumindo aproximadamente 40% do oxigênio placentário (CARTER, 2000). Além disso, a placenta hemocorial, presente em humanos, roedores e primatas não-humanos, possui alta plasticidade e é responsiva à hipóxia, uma vez que a diferenciação das células trofoblásticas ocorre sob a influência de hipóxia e expressão do fator 1α induzido pela hipóxia (HIF1 α) (CHAKRABARTI *et al.*, 2016; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017; WAKELAND *et al.*, 2017).

No entanto, o estresse oxidativo, bem como a via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), envolvida na ativação do estresse de retículo endoplasmático, também estão envolvidos na diferenciação das células trofoblásticas e podem ser ativados pela hipóxia (GUZEL *et al.*, 2017; SCHOOTS *et al.*, 2018). O estresse oxidativo é caracterizado pela alta produção de espécies reativas de oxigênio, formadas principalmente na mitocôndria e no retículo endoplasmático (MAILLOUX, 2020; SCHOOTS *et al.*, 2018). Por muitos anos, foi demonstrado que as espécies reativas de oxigênio eram maléficas para o organismo. Entretanto, estudos têm demonstrado que elas também desempenham papéis importantes como mensageiros secundários em muitas vias de sinalização intracelulares envolvidas no crescimento, diferenciação e morte celular (SIES, 2017; SIES; BERNDT; JONES, 2017; ZHANG *et al.*, 2016b). A placenta responde à elevação de espécies reativas de oxigênio por meio do aumento da produção de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (BURTON *et al.*, 2021). Contudo, o perfil de expressão de HIF1 α e mediadores antioxidantes ao longo do desenvolvimento placentário carece de mais estudos.

A ativação da via da UPR é também essencial para a placentação, uma vez que falhas na expressão de algumas de suas proteínas sinalizadoras como PERK, IRE1 α e ATF6 podem acarretar problemas na implantação do embrião ou na própria gestação (MICHALAK; GYE, 2015). Além disso, estudos demonstraram que PERK, IRE1 α e ATF6 estão envolvidos na expressão do fator de crescimento de endotélio vascular A (VEGF-A), principal fator envolvido na angiogênese e vasculogênese placentárias (GHOSH *et al.*, 2010; IWAWAKI *et*

al., 2009; PEREIRA *et al.*, 2015). Yoshida *et al.* (2021) também mostraram que a indução de estresse de retículo endoplasmático, por meio da ativação de PERK e IRE1 α pela alfa 1 anti-tripsina (A1AT), promoveu invasão trofoblástica, sugerindo que a desregulação na expressão de mediadores da UPR pode estar envolvida em doenças gestacionais que cursam com falhas na migração trofoblástica intrauterina, como a pré-eclâmpsia. Bastida-Ruiz *et al.* (2019) também demonstraram que a inibição da UPR está envolvida no processo de fusão e diferenciação das células trofoblásticas, reforçando a relevância da UPR no desenvolvimento placentário e como respostas adaptativas da placenta ao estresse de retículo endoplasmático são fisiologicamente importantes.

Todos esses estudos têm sido realizados no intuito de estabelecer o papel do estresse oxidativo e reticular na placentação e disfunções placentárias. No entanto, ainda carece de mais estudos o perfil placentário de enzimas antioxidantes, bem como de HIF1 α e mediadores da UPR, durante a placentação ao longo da gestação. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão espaço-temporal de HIF1 α , enzimas antioxidantes e mediadores da UPR na placenta de ratas na segunda metade da gestação.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Delineamento experimental

Ratas Wistar adultas (230-250g) foram utilizadas neste estudo. As ratas foram alojadas em caixas plásticas e alimentadas com a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura ambiente (22 °C) controladas. O ciclo estral foi monitorado diariamente. Após a verificação de dois ciclos estrais completos (proestro, estro, diestro), as ratas em proestro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas durante a noite. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram realizados e as cópulas foram confirmadas pela presença de espermatozoides na citologia vaginal. Esse dia foi designado como dia 0 de gestação. As ratas foram eutanasiadas no 10º, 12º, 14º, 16º e 18º dia de gestação (DG) (N= 6/grupo). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 002/17) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

5.4.2 Eutanásia e coleta de material

Ao atingir a idade gestacional estabelecida, as ratas foram eutanasiadas com auxílio de

guilhotina. Na necropsia, os úteros juntamente com as placentas e os fetos foram coletados e oito discos placentários por animal foram retirados e dissecados. Dois discos foram separados da decídua basal+triângulo metrial e armazenados individualmente em criotubos contendo Trizol, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para posterior realização de qPCR. Outros seis discos placentários juntamente com a decídua foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas, desidratados em solução seriada de álcool 70% até álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura em lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany) para realização da imuno-histoquímica.

5.4.3 Imuno-histoquímica (IHC)

Cortes histológicos da placenta com a decídua foram submetidas à análise imuno-histoquímica utilizando a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA). A recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 °C com solução de ácido cítrico (0,54 mol/L; pH 6,0) e a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:1000 foi *overnight* em câmara úmida. Os anticorpos utilizados foram anti-HIF1α (sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-SOD1 (sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GPx1/2 (sc-133160, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-catalase (sc-271803, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GRP78 (sc- 13539, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-CHOP (sc-71136, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). As lâminas foram incubadas por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA) e estreptavidina peroxidase. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). As secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução tamponada de fosfato (PBS) (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014)

Foram realizadas avaliações descritivas e quantitativas da imunomarcagem de HIF1α, SOD1, catalase, GPx1/2, GRP78 e CHOP na zona juncional (ZJ) e labirinto placentário(LP). A avaliação quantitativa foi realizada aleatoriamente em um disco placentário/rata totalizando 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. A área de imunomarcagem foi determinada por meio do software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA).

Para a análise, *color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada camada da placenta foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

5.4.4 PCR em tempo real (qPCR)

Para a realização da técnica de qPCR, primeiramente foi extraído o mRNA das placentas utilizando Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo o protocolo do Kit. A síntese do cDNA foi realizada com 1 µg de RNA por meio do Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando PowerUp™ SYBR™ Green (Master Mix Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green, Thermo Fisher Scientific) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1µL de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 µL do reagente PowerUP em um volume final de 15 µL de reação. No 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 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Foi realizado um teste de eficiência da amplificação da qPCR utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de RNA *polymerase II subunit A (Polr2a)* de *Rattus norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SOLANO et al., 2016).

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.

Genes	Iniciadores	Nº acesso
<i>Hif1a</i>	Forward: AGCAATTCTCCAAGCCCTCC Reverse: TTCATCAGTGGTGGCAGTTG	NM_024359.1
<i>Sod1</i>	Forward: GAAAGGACGGTGTGGCCAAT Reverse: CTCGTGGACCACCATAGTACG	NM_017050.1
<i>Gpx1</i>	Forward: GCGCTACAGCGGATTTTTGA Reverse: GAAGGCATACACGGTGGACT	NM_030826.3
<i>Atf6</i>	Forward: CCAGCAGAAAACCCGCATTC Reverse: CAGAATTCCTGATGCTAGTGGTT	NM_017598829.1

<i>Perk</i>	Forward: GGCTGGTGAGGGATGGTAAA Reverse: TTGGCTGTGTAACCTTGTGTCATCA	NM_031599.2
<i>Grp78</i>	Forward: TGAAGGGGAGCGTCTGATTG Reverse: TCATTCCAAGTGCGTCCGAT	NM_013083.2
<i>Chop</i>	Forward: TGGCACAGCTTGCTGAAGAG Reverse: TCAGGCGCTCGATTTCCT	NM_001109986.1
<i>Polr2a</i>	Forward: GCTGGACCTACTGGCATGTT Reverse: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	NM_001079162.5

5.4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Realizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *Student Newman Keuls* (SNK) e os dados passaram pelos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) dos erros. Para as análises foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.2 e as diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Perfil de expressão de HIF1 α na placenta de ratas ao longo da gestação

Primeiramente, objetivou-se identificar o perfil de imunomarcacão e expressão gênica de HIF1 α , um marcador de hipóxia (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017), na placenta de ratas na segunda metade da gestação. A análise imuno-histoquímica mostrou que HIF1 α é expresso em células trofoblásticas tanto na zona juncional (ZJ) quanto no labirinto placentário (LP), com uma marcação nula a moderada, citoplasmática e heterogênea (Figura 1). Na ZJ, uma maior área de imunomarcacão de HIF1 α foi observada aos 16 DG em relação aos 14 DG (Figura 1A e B; $P < 0,05$), diferentemente do LP onde houve maior expressão aos 18 DG (Figura 1 e B; $P < 0,05$; $P < 0,01$). A imunomarcacão no LP nas outras idades gestacionais foi fraca ou ausente. Em relação à expressão gênica, *Hif1 α* apresentou maior expressão de mRNA no 12º e 16º DG em relação às outras idades gestacionais (Figura 1C). Esses dados demonstram que a expressão placentária de HIF1 α difere entre as regiões da placenta e ocorre principalmente no 16º e 18º DG.

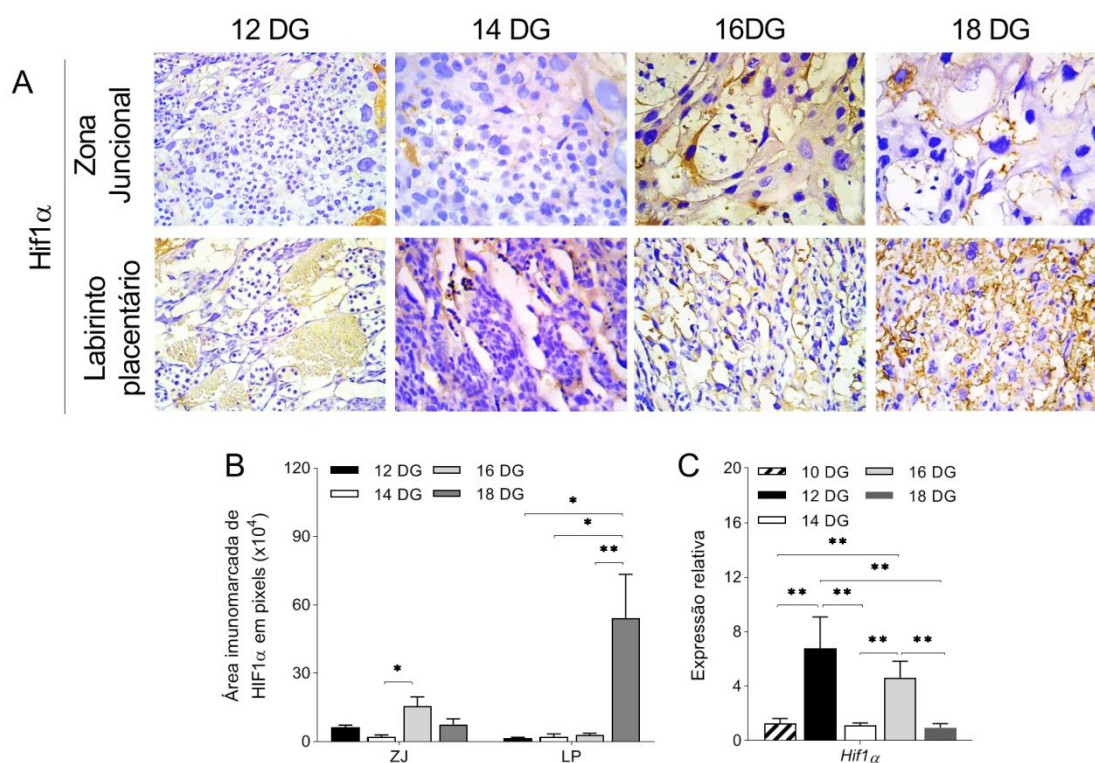


Figura 1-Perfil de expressão de HIF1α na placenta de ratas ao longo da gestação. A) Fotomicrografias da imunomarcacão de HIF1α na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μm). B) Área de imunomarcacão em pixels de HIF1α na zona juncional e labirinto placentário. C) Expressão gênica relativa do *Hif1α* na placenta de ratas aos 10, 12, 14, 16 e 18 DG (média ± SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.

5.5.2 Perfil de expressão de enzimas antioxidantes na placenta de ratas ao longo da gestação

Considerando que a expressão de HIF1α foi maior em dois períodos gestacionais, avaliamos a imunomarcacão das principais enzimas antioxidantes responsáveis por proteger os tecidos da hipóxia e, conseqüentemente, do estresse oxidativo. A imunomarcacão de SOD1, GPx1/2 e CAT foi citoplasmática e heterogênea em células trofoblásticas tanto na ZJ quanto no LP em todos os períodos gestacionais, sendo que a expressão de SOD1 foi mais intensa que GPx1/2 e CAT (Figura 2A,C,E). A imunomarcacão de SOD1 e CAT foi maior no 14º e 18º DG, tanto na ZJ quanto no LP (Figura 2B e F), enquanto a expressão de GPx1/2 foi maior somente no 18º DG para ambas as regiões da placenta (Figura 2D).

A análise de expressão gênica demonstrou que *Sod1*, semelhante ao *Hif1α*, apresentou maior expressão de mRNA no 12º e 16º DG quando comparado aos outros períodos gestacionais, enquanto *Gpx1* exibiu maior expressão de transcritos no 10º e 16º DG (Figura 2G). A *Cat*, por outro lado, apresentou um pico de expressão gênica no 14º DG, diminuindo

sua expressão no decorrer da gestação (Figura 2G).

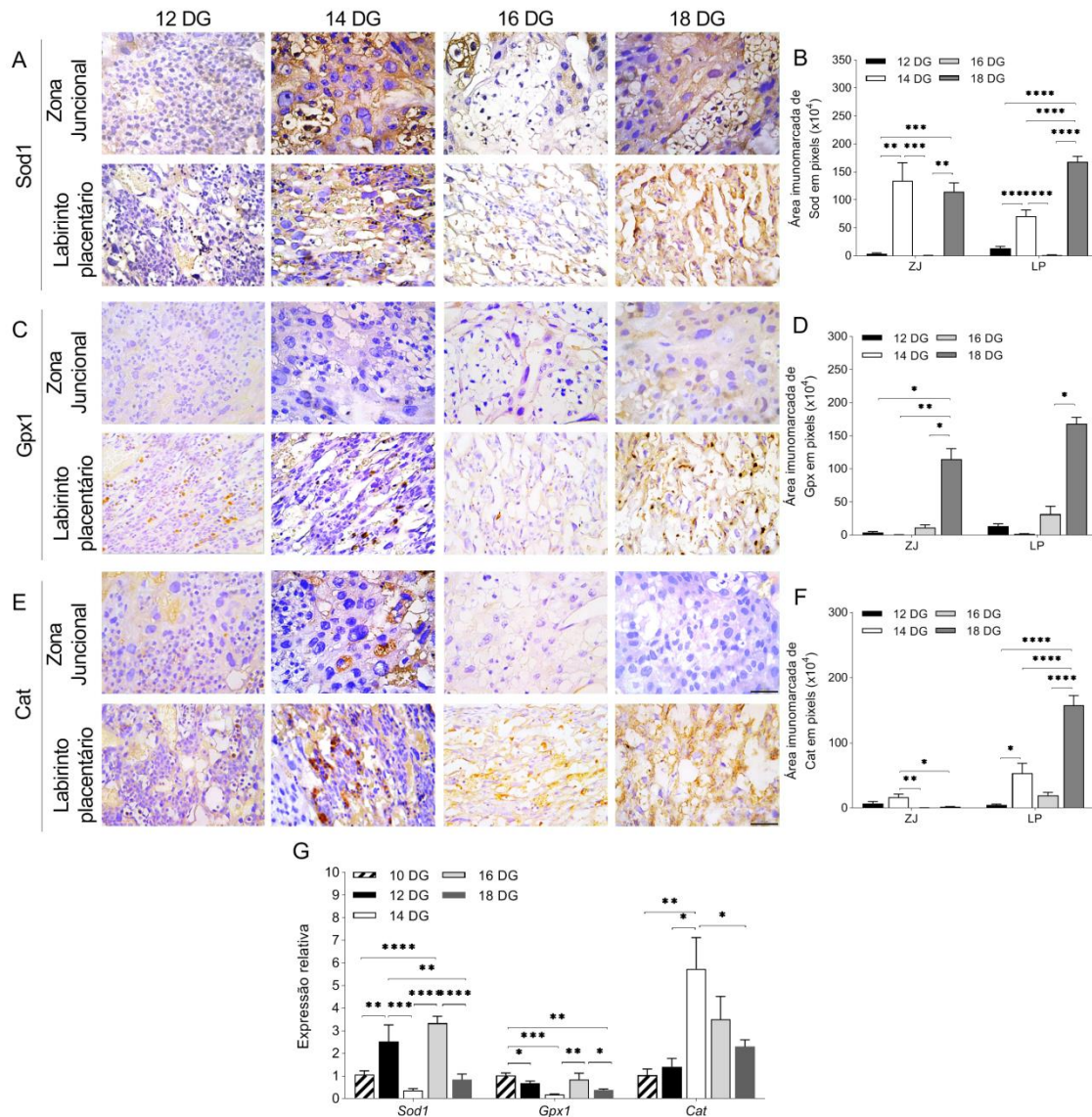


Figura 2-Perfil de expressão das enzimas antioxidantes SOD1, GPx e catalase na placenta de ratas ao longo da gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcagem de SOD1, GPx1/2 e catalase na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B-F) Área de imunomarcagem em pixels de SOD1 (B), GPx1/2 (D) e catalase (F) na zona juncional e labirinto placentário. Z₄) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Gpx1* e *Cat* na placenta de ratas aos 10, 12, 14, 16 e 18 DG (média $\pm$ SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.

5.5.3 Perfil de expressão de mediadores da UPR na placenta de ratas ao longo da gestação

Pelo fato de alguns estudos terem demonstrado uma associação entre a ocorrência de estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático (BURTON; YUNG, 2011) e que a

ativação da UPR é também importante para alguns processos fisiológicos durante a placentação, como a invasão trofoblástica intrauterina (YOSHIDA *et al.*, 2021), foi avaliado o perfil de expressão placentária de GRP78, CHOP, PERK e ATF6. A imunomarcação de GRP78 e CHOP foi fraca a moderada, citoplasmática e heterogênea na ZJ e LP (Figura 3A, C). Curiosamente, a expressão proteica desses mediadores foi semelhante, com maior expressão no LP aos 18 DG em relação aos outros períodos gestacionais ($P < 0,01$), enquanto na ZJ não houve diferença significativa ao longo da gestação (Figura 3B-D; $P > 0,05$).

Em relação à expressão gênica, além de *Chop* e *Grp78*, também foi verificada a expressão de transcritos para *Atf6* e *Perk*, que representam duas proteínas transmembrana envolvidas na ativação inicial da UPR (VEERBEEK *et al.*, 2015). A expressão de transcritos para *Atf6* foi maior nos estágios iniciais da placentação, principalmente no 12º DG em relação aos outros estágios gestacionais (Figura 3E), enquanto *Perk* apresentou uma expressão maior e uniforme do 12º ao 16º DG. *Grp78*, por sua vez, exibiu maior expressão gênica no 14º DG, enquanto *Chop* apresentou uma expressão alta e uniforme do 12º até o 18º DG (Figura 3E; $P < 0,01$). Em conjunto, os dados de imunomarcação e expressão gênica demonstram que há ativação da UPR na placenta de ratas ao longo da gestação e sugerem a ocorrência de estresse reticular no labirinto placentário principalmente no final da gestação.

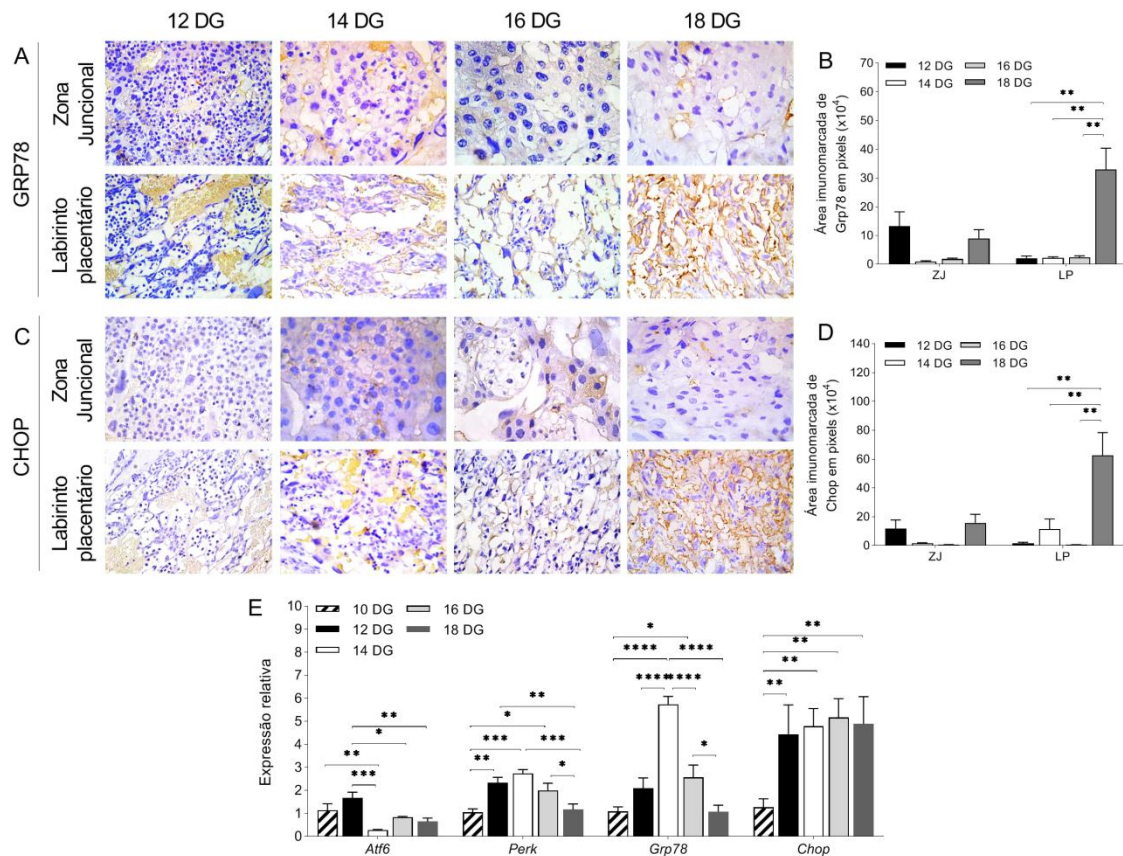


Figura 3-Perfil da expressão de mediadores da UPR na placenta de ratas ao longo da gestação. A-C) Fotomicrografias da imunomarcagem de GRP78 e CHOP na zona juncional e labirinto placentário de ratas aos 12, 14, 16 e 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B-D) Área de imunomarcagem em pixels de GRP78 (B) e CHOP (D) na zona juncional e labirinto placentário. E) Expressão gênica relativa de *Atf6*, *Perk*, *Grp78* e *Chop* na placenta de ratas aos 10, 12, 14, 16 e 18 DG (média $\pm$ SEM, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 e **** p <0.0001; Teste SNK; N= 6/grupo). ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de gestação.

5.6 DISCUSSÃO

Este estudo caracterizou pela primeira vez o perfil de expressão placentária de HIF1 α , de enzimas antioxidantes e mediadores da UPR na segunda metade da gestação em ratas, demonstrando que a expressão dos mesmos varia com a região da placenta e são influenciados pela idade gestacional, com maior expressão nos períodos de maior expressão de HIF1 α e ao final da gestação.

A imunomarcagem de HIF1 α foi maior no 16 $^{\circ}$ e 18 $^{\circ}$ DG, principalmente no labirinto placentário, sugerindo idades gestacionais que estão sob um ambiente de hipóxia, enquanto a expressão do mRNA foi maior no 12 $^{\circ}$ e 16 $^{\circ}$ DG. Essa diferença temporal entre a expressão gênica e proteica pode ser reflexo dos processos de transcrição e translação que nem sempre

ocorrem simultaneamente (LIU; SIMON, 2004), mas também devido à meia-vida curta do mRNA ou feedback negativo da transcrição (Hardin et al., 1992; Vogel and Marcotte, 2012). Além disso, em um ambiente de hipóxia, a síntese proteica global é reduzida para conservar o ATP, enquanto a transcrição de HIF1 α , que é crítica para a resposta a hipóxia é mantida (LIU; SIMON, 2004). Interessantemente, os resultados de HIF1 α coincidem com o estabelecimento da placenta definitiva na rata e com o início da migração trofoblástica intrauterina, por volta do 12º DG, e com o pico da invasão trofoblástica que ocorre no 18º DG (SILVA; SERAKIDES, 2016; VERCRUYSE et al., 2006). Esse pico da invasão trofoblástica aos 18ºDG contribui para a remodelação das artérias espiraladas uterinas e para o aumento do fluxo sanguíneo materno para a placenta e consequentemente maior demanda de O₂ neste momento que o feto e a placenta apresentam altas taxas de crescimento (BURTON; JAUNIAUX, 2018; KNÖFLER et al., 2019; PIJNENBORG; VERCRUYSE; HANSSENS, 2006).

Neste estudo, foi também verificado maior imunomarcagem placentária de SOD1, GPX1/2 e CAT no 14º e 18º DG, enquanto maior expressão de mRNA para *Sod1* e *Gpx1* ocorreu no 12º e/ou 16º DG, períodos de maior expressão gênica de *Hif1 α* . Sabe-se que a hipóxia modula o desenvolvimento placentário e estimula a invasão trofoblástica endovascular no processo de remodelamento das artérias espirais uterinas (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008). Assim, a maior expressão das enzimas antioxidantes nos períodos de maior invasão trofoblástica intrauterina na rata condiz com os períodos de maior expressão de HIF1 α observado neste estudo, uma vez que tanto o aumento de HIF1 α quanto das espécies reativas de oxigênio promove o aumento na produção de antioxidantes para que o equilíbrio da homeostase redox seja mantido no ambiente celular (BURTON; YUNG, 2011; HERNANDEZ et al., 2019; JAUNIAUX et al., 2000). Interessantemente, a expressão gênica de *Cat* apresentou um pico no 14º DG, diminuindo no decorrer da gestação. Isso demonstra que embora as enzimas antioxidantes na interface materno-fetal sejam expressas para manter a homeostase redox local (HERNANDEZ et al., 2019) nem todas são expressas ao mesmo tempo, demonstrando que há diferença na expressão temporal entre as enzimas antioxidantes na placenta de ratas na segunda metade da gestação.

Este estudo também caracterizou pela primeira vez o perfil placentário de mediadores da UPR na segunda metade da gestação na rata. Avaliamos inicialmente a imunomarcagem de GRP78 e CHOP, que são os principais marcadores estudados e que indicam ativação da UPR e, dessa maneira, a ocorrência de estresse de retículo endoplasmático (BASTIDA-RUIZ et al., 2019; HAN et al., 2013; HE et al., 2015).

Interessantemente, a imunomarcagem de GRP78 e CHOP foram semelhantes, apresentando maior expressão no labirinto placentário e no 18º DG, enquanto *Grp78* apresentou maior expressão de transcritos no 14º e *Chop* do 12º ao 18º DG. Esses dados sugerem que a ativação de UPR na placenta de ratas no labirinto placentário pode estar também relacionado ao aumento substancial do crescimento fetal e placentário no 18º DG, uma vez que a UPR estar diretamente associado à regulação da expressão do VEGF-A, fator de crescimento envolvido na angiogênese que atua no desenvolvimento do labirinto placentário, local de oxigênio e troca de nutrientes entre a mãe e o feto (GHOSH *et al.*, 2010; IWAWAKI *et al.*, 2009; REYNOLDS *et al.*, 2009).

Já a ativação de UPR na placenta de ratas no final da gestação pode estar associada ao estresse de retículo endoplasmático que ocorre na interface materno-fetal para a ocorrência do parto, como já foi demonstrado na placenta de mulheres parturientes (LIONG; LAPPAS, 2014; VEERBEEK *et al.*, 2015). Estudos já demonstraram que próximo ao parto há aumento de apoptose na interface materno-fetal, como também de citocinas pró-inflamatórias, dois processos que são estimulados pela ativação do estresse de retículo endoplasmático (BURTON *et al.*, 2009; GARGALOVIC *et al.*, 2006; HUPPERTZ; KADYROV; KINGDOM, 2006; KAZEMI *et al.*, 2021; LIONG; LAPPAS, 2014; ZHANG; KAUFMAN, 2008). Além disso, o próprio processo de apoptose está envolvido no remodelamento das artérias espirais uterinas (HARRIS, 2011; SILVA; SERAKIDES, 2016; WHITLEY; CARTWRIGHT, 2009), o que pode justificar o aumento da expressão gênica de *Chop* desde o 12º DG e o pico de expressão de *Grp78* no 14º dia. É importante ressaltar que o aumento da expressão placentária do HIF1 α observado no presente estudo no 16º e 18º DG também pode estar associado à ativação de GRP78 e CHOP, uma vez que o HIF1 α também está envolvido na ativação da UPR (AKMAN *et al.*, 2021).

No entanto, o aumento placentário de *Grp78* no 14º DG pode também estar envolvido em processos fisiológicos da própria célula trofoblástica, uma vez que estudos *in vitro* utilizando células trofoblásticas BeWo e cultivo de citotrofoblasto viloso humano a termo demonstraram que a ativação de GRP78 está envolvida na sincicialização e diferenciação trofoblástica (BASTIDA-RUIZ *et al.*, 2019, 2020; FRADET *et al.*, 2012). No entanto, mais estudos *in vivo* são necessários para compreender o papel da expressão de mediadores da UPR na segunda metade da gestação na rata, uma vez que há diferenças morfofisiológicas entre a placenta de humanos e de roedores (SILVA; SERAKIDES, 2016).

Além de *Grp78* e *Chop*, também foi avaliado a expressão gênica de *Atf6* e *Perk*, que estão associados a proteínas transmembranas envolvidas na ativação inicial da UPR.

Semelhante a *Grp78*, *Perk* também apresentou maior expressão no 14º DG, enquanto *Atf6* teve maior expressão no 10º e 12º DG, demonstrando que embora sejam mediadores da ativação inicial da UPR, temporalmente são expressos em períodos diferentes. Essa diferença temporal pode ser reflexo das vias de ativação que estão envolvidas na UPR, uma vez que PERK e ATF6 estão envolvidos em vias diferentes, como a do eIF2 α /ATF4 e do XBP1, respectivamente (ALMANZA *et al.*, 2019; BAILEY *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2019; MANCINI *et al.*, 2013; RODRIGUEZ; ROJAS-RIVERA; HETZ, 2011; RON; HARDING, 2012).

Os achados deste estudo demonstraram pela primeira vez que a expressão placentária de enzimas antioxidantes na rata, bem como de mediadores da UPR, varia de acordo com a região da placenta e estão sob influência da idade gestacional, com maior expressão nos períodos de maior expressão de HIF1 α e ao final da gestação.

6 CAPÍTULO 2

HIPOTIREOIDISMO MATERNO CAUSA ESTRESSE OXIDATIVO E ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA INTERFACE MATERNO-FETAL DE RATAS

**Maternal hypothyroidism causes oxidative stress and endoplasmic reticulum stress at
the maternal-fetal interface of rats**

6.1 RESUMO

O hipotireoidismo materno está associado a pré-eclâmpsia, aborto e restrição de crescimento intrauterino, doenças gestacionais que apresentam estresse oxidativo (EO) e estresse de retículo endoplasmático (ERE) na placenta. No entanto, ainda não se sabe se o hipotireoidismo também causa EO e ERE na interface materno-fetal. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento feto-placentário e a expressão de mediadores de EO e da resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR) na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas. O hipotireoidismo foi induzido em ratas Wistar gestantes com propiltiouracil (PTU) e foram analisados o desenvolvimento feto-placentário e a expressão placentária e decidual de mediadores antioxidantes (Sod1, Sod2, Cat, Gpx1/2, GST, Nrf2), de hipóxia (Hif1 α), de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG) e da UPR (Perk, Atf6, Atf4, Xbp1, HO1, Grp78 e Chop) aos 14 e 18 dias de gestação (DG). O hipotireoidismo reduziu o peso fetal aos 14 e 18 DG, além de aumentar a porcentagem de morte fetal e reduzir o peso da unidade útero-placenta aos 18 DG. Aos 14 DG houve maior imunomarcagem decidual e/ou placentária de Hif1 α , 8-OHdG, SOD1, GPx1/2, Grp78 e CHOP nas ratas hipotireoideas, enquanto houve redução da expressão gênica placentária e/ou decidual de *Sod1*, *Gpx1*, *Atf6*, *Perk*, *Ho1*, *Xbp1*, *Grp78* e *Chop* no mesmo período gestacional. Já aos 18 DG, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem decidual e/ou placentária de Hif1 α , 8-OHdG, ATF4, Grp78 e CHOP, enquanto reduziu a imunomarcagem e atividade enzimática de Sod1, CAT, GST. O hipotireoidismo também aumentou a expressão placentária de mRNA para *Hif1 α* , *Nrf2*, *Sod2*, *Gpx1*, *Cat*, *Perk*, *Atf6* e *Chop* aos 18 DG, enquanto reduziu a expressão decidual de *Sod2*, *Cat* e *Atf6*. Conclui-se que a restrição feto-placentária em ratas com hipotireoidismo está associada com uma desregulação na expressão placentária e decidual de mediadores da UPR e enzimas antioxidantes e com a ativação de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático na interface materno-fetal.

Palavras-chave: tireoide; estresse celular; estresse reticular; antioxidantes; rata.

6.2 ABSTRACT

Maternal hypothyroidism is associated with pre-eclampsia, abortion and intrauterine growth restriction, gestational diseases involving oxidative stress (OS) and endoplasmic reticulum stress (ERS) in the placenta. However, it is not known whether hypothyroidism also causes OS and ERS at the maternal-fetal interface. The aim of this study was to evaluate the fetal-placental development and the expression of mediators of OS and of the unfolded protein response (UPR) in the maternal-fetal interface of hypothyroid rats. Hypothyroidism was induced in pregnant Wistar rats with propylthiouracil (PTU) and the fetal-placental development and placental and decidual expression of antioxidant (Sod1, Sod2, Cat, Gpx1/2, GST, Nrf2) and hypoxia (Hif1 α) mediators were analyzed at 14 and 18 days of gestation (DG), as well the expression of 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, and UPR mediators (Perk, Atf6, Atf4, Xbp1, HO1, Grp78 and Chop). Hypothyroidism reduced fetal weight at 14 and 18 DG, in addition to increasing the percentage of fetal death and reducing the weight of the uteroplacental unit at 18 DG. At 14 DG, there was greater decidual and/or placental immunostaining of Hif1 α , 8-OHdG, SOD1, GPx1/2, Grp78 and CHOP in hypothyroid rats, while there was a reduction in placental and/or decidual gene expression of *Sod1*, *Gpx1*, *Atf6*, *Perk*, *Ho1*, *Xbp1*, *Grp78* and *Chop* in the same gestational period. At 18 DG, hypothyroidism increased the decidual and/or placental immunostaining of HIF1 α , 8-OHdG, ATF4, GRP78 and CHOP, while it reduced the immunostaining and enzymatic

activity of SOD1, CAT, GST. Hypothyroidism also increased the placental mRNA expression of *Hif1 α* , *Nrf2*, *Sod2*, *Gpx1*, *Cat*, *Perk*, *Atf6* and *Chop* at 18 DG, while decreasing the decidual expression of *Sod2*, *Cat* and *Atf6*. It is concluded that fetal-placental restriction in female rats with hypothyroidism is associated with dysregulation in placental and decidual expression of UPR mediators and antioxidant enzymes, and activation of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress at the maternal-fetal interface.

Keywords: thyroid, cellular stress, reticular stress, antioxidants, rat

6.3 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são importantes na gestação, pois regulam o metabolismo materno e o desenvolvimento placentário e fetal (FORHEAD; FOWDEN, 2014; FOWDEN; FORHEAD, 2022; KOREVAAR *et al.*, 2017; KRASSAS, 2000; KRASSAS; POPPE; GLINOER, 2010). Por isso, a hipofunção tireoidiana está associada à complicações gestacionais como parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino (RCIU), aborto e pré-eclâmpsia (GUI; XU; ZHANG, 2020; KOREVAAR *et al.*, 2017; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Todas essas doenças apresentam falhas na invasão e migração trofoblástica intrauterina (BROSENS; PUTTEMANS; BENAGIANO, 2019; BURTON; YUNG, 2011; REDMAN; SARGENT, 2009; REDMAN; SARGENT; STAFF, 2014), inclusive a disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014), sendo que falhas na migração trofoblástica comprometem o remodelamento das artérias espiraladas uterinas e, conseqüentemente, o fornecimento de sangue oxigenado para a interface materno-fetal (BROSENS *et al.*, 2011; BURTON; JAUNIAUX, 2018).

Má perfusão da interface materno-fetal causa estresse oxidativo (EO) e estresse de retículo endoplasmático (ERE) na placenta (BURTON; JAUNIAUX, 2018), processos chaves na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e da RCIU (AOUACHE *et al.*, 2018). O EO é resultante do desequilíbrio entre os altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxidos e H₂O₂, e baixas concentrações de antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPx) (MAILLOUX, 2020; SCHROOTS *et al.*, 2018; SHENG *et al.*, 2014). O excesso de EROs causa danos ao DNA, peroxidação lipídica e perda de função de organelas, como também redução na produção de ATP, falha na sinalização celular e até morte celular por apoptose, necrose ou piroptose (BURTON; JAUNIAUX, 2004; CHENG *et al.*, 2019; SCHROOTS *et al.*, 2018). A redução dos níveis de ATP dentro da célula também compromete a homeostase de Ca²⁺ e a função das enzimas responsáveis pelo enovelamento

das proteínas, podendo causar também o ERE (BURTON; YUNG, 2011; VEERBEEK *et al.*, 2015).

O ERE ocorre devido ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, que ativam a via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, *Unfolded Protein Response*). Essa via é controlada por três proteínas transmembrana, a quinase do RE semelhante à proteína quinase do RNA (PERK), a enzima 1 α requerente de inositol (IRE1 α) e o fator 6 de ativação transcricional (ATF6) (VEERBEEK *et al.*, 2015). Caso não ocorra retorno da função normal da organela, ocorre a ativação da via de degradação de proteínas associada ao RE (ERAD), além da ativação da proteína homóloga pró-apoptótica C/EBP (CHOP), que promove a apoptose (ALMANZA *et al.*, 2019; VEERBEEK *et al.*, 2015).

Sabe-se que os hormônios tireoidianos são importantes reguladores do consumo de oxigênio e de antioxidantes no organismo (MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008), sendo que a hipofunção tireoidiana afeta a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria gerando EROs (CHAKRABARTI *et al.*, 2016), além de comprometer a atividade antioxidante e o metabolismo lipídico (MANCINI *et al.*, 2016). Contudo, mesmo já tendo sido comprovado que o hipotireoidismo afeta o estado redox em diversos órgãos, como pâncreas, cérebro, fígado e coração (MANCINI *et al.*, 2016; MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008; SAJADIAN *et al.*, 2016; ZHANG; DONG; SU, 2016), ainda não foi confirmado se o hipotireoidismo materno causa EO na interface materno-fetal. Estudos demonstraram que o hipotireoidismo reduz a expressão de metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, interleucina 10 (IL-10) e óxido nítrico sintetase 2 (NOS2) na placenta (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014), sendo que redução de IL-10 e NOS2 na interface materno-fetal está associada ao EO placentário observado no aborto, parto prematuro, natimortalidade e pré-eclâmpsia (HARMON *et al.*, 2015; KALKUNTE *et al.*, 2011; LIAN *et al.*, 2011; ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008). Além disso, ativação *in vitro* de ERE reduz a expressão de MMP2 e a invasividade de células trofoblásticas JEG-3 (LEE *et al.*, 2020), embora não haja estudos que tenham avaliado a ocorrência de ERE na interface materno-fetal de mulheres ou animais com hipotireoidismo.

Desse modo, considerando que o hipotireoidismo é uma das principais endocrinopatias que afeta a gestação (IDRIS *et al.*, 2005; ZHANG; DONG; SU, 2016), o objetivo deste estudo foi avaliar se o hipotireoidismo materno causa EO e/ou ERE na decídua e placenta de ratas ao longo da gestação. Os achados deste estudo demonstraram que a restrição feto-placentária em ratas com hipotireoidismo está associada com uma desregulação na expressão placentária e

decidual de mediadores da UPR e enzimas antioxidantes com a ativação de EO e ERE na interface materno-fetal.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Delineamento experimental

Ratas Wistar adultas (230-250 g) foram utilizadas neste estudo. As fêmeas foram alojadas em caixas plásticas e alimentadas com a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de luminosidade (12 h de luz/ 12 h de escuro) e temperatura (22 °C) controladas.

Após um período de 7 dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, nos grupos controle e hipotireoideo. O ciclo estral das ratas foi monitorado diariamente. Após a verificação de dois ciclos estrais completos, foi realizada a indução ao hipotireoidismo. Os animais receberam diariamente, por sonda orogástrica, durante três dias, 4mg/Kg de 6-propil-2-tiouracil (PTU) em 3 mL de água destilada. Os animais do grupo controle receberam o mesmo volume de água destilada como placebo (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Após três dias do início do tratamento, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal e as ratas em proestro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas durante a noite. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram realizados e as cópulas foram confirmadas pela presença de espermatozoides nas citologias vaginais. Esse dia foi designado como dia 0 de gestação. Os tratamentos com PTU e água nos grupos hipotireoideo e controle, respectivamente, ocorreram diariamente até o dia da eutanásia. As eutanásias das ratas foram realizadas no dia 0 de gestação, para dosagem de T3 e T4 livres e confirmação do hipotireoidismo, e no 14º e 18º dias de gestação para coleta dos discos placentários (6-7 animais/grupo). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) (CEUA nº 002/17).

6.4.2 Necropsia e coleta de material

As ratas foram eutanasiadas com auxílio de guilhotina. Após a eutanásia, 5 mL de sangue foram coletados em tubos com heparina para obtenção do plasma. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos e o plasma obtido foi armazenado a -20 °C.

Na necropsia, os úteros juntamente com as placentas e fetos foram coletados. Foi realizada a pesagem do útero contendo a placenta e os fetos, do útero com placenta, e dos fetos individualmente. Foram também contabilizados o número de fetos e o número de sítios com reabsorção ou morte fetal. Esses fetos foram posteriormente excluídos. Oito discos

placentários de cada grupo, de ambos os cornos, foram colhidos. Aleatoriamente, dois discos placentários foram retirados, dissecados e separados das decíduas. Um dos discos foi acondicionado em microtubo, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente estocado a -80°C para avaliação da atividade de enzimas antioxidantes. O outro disco placentário e as decíduas foram armazenados individualmente em criotubos contendo Trizol, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para posterior realização de qPCR. Os seis discos remanescentes foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas, e posteriormente processados e incluídos em parafina. Cortes de 4µm de espessura em lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany) foram obtidos para realização de imuno-histoquímica.

6.4.3 Análise hormonal

A dosagem de T3 e T4 livres foi realizada por meio do ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (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 e 7%, respectivamente.

6.4.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Cortes histológicos da placenta com a decídua basal+triângulo metrial foram submetidos à análise imuno-histoquímica. Os anticorpos utilizados foram anti-HIF1α (1:1000, sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-8OHdG (1:200, sc-393871, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-SOD1 (1:1000, sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GPx1/2 (1:1000, sc-133160, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-catalase (1:1000, sc-271803, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-ATF4 (1:1000, sc-390063, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GRP78 (1:1000, sc-13539, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-CHOP (1:1000, sc-71136, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 °C utilizando solução de ácido cítrico (0,54 mol/L, pH 6,0). As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com os anticorpos primários. O bloqueio da peroxidase endógena e as incubações com soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e estreptavidina peroxidase ocorreram por 30 minutos em cada etapa. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA).

USA). Por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução tamponada de fosfato (PBS)(SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

As avaliações das imunomarcações de HIF1 α , 8-OHdG, SOD1, GPx1/2, catalase, ATF4, GRP78 e CHOP foram descritivas e quantitativas nas regiões da decídua basal+triângulo metrial, zona juncional e labirinto placentário da interface materno-fetal. A avaliação quantitativa foi realizada aleatoriamente em seis discos placentários/grupo e utilizando imagens de 5 campos aleatórios de cada região avaliada. Para isso, imagens foram obtidas com um Microscópio fotônico Leica DMI 300B (Leica Microsystems, Germany) com a objetiva 40x. Para essa avaliação foi utilizado o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada região da interface materno-fetal foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

6.4.5 PCR em tempo real (qPCR)

Para a realização da técnica de qPCR, primeiramente foi extraído o mRNA dos discos placentários e das decíduas utilizando Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme o protocolo do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada com 1 μ g de RNA, utilizando o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando PowerUp™ SYBR™ Green (Master Mix Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green, Thermo Fisher scientific) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1 μ L de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 μ L do reagente PowerUP em um volume final de 15 μ L de reação. No 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 3 s, e anelamento/extensão a 60 °C por 30 s. Foi realizado um teste de eficiência da amplificação da qPCR, utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de *RNA polymerase II subunit A (Polr2a)* de *Rattus*

norvegicus(SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SOLANO *et al.*, 2016).

Tabela 1: Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.

Genes	Iniciadores	Nº acesso
<i>Hif1a</i>	Forward: AGCAATTCTCCAAGCCCTCC Reverse: TTCATCAGTGGTGGCAGTTG	NM_024359.1
<i>Nrf2</i>	Forward: CCCATTGAGGGCTGTGATCT Reverse: GCCTTCAGTGTGCTTCTGGTT	NM_031789.2
<i>Sod1</i>	Forward: GAAAGGACGGTGTGGCCAAT Reverse: CTCGTGGACCACCATAGTACG	NM_017050.1
<i>Sod2</i>	Forward: CGGGGGCCATATCAATCACA Reverse: GCCTCCAGCAACTCTCCTTT	NM_017051.2
<i>Gpx1</i>	Forward: GCGCTACAGCGGATTTTGA Reverse: GAAGGCATACACGGTGGACT	NM_030826.3
<i>Cat</i>	Forward: CTGACTGACGCGATTGCCTA Reverse: GTGGTCAGGACATCGGGTTT	NM_012520.2
<i>Atf6</i>	Forward: CCAGCAGAAAACCCGCATTC Reverse: CAGAATTCCTGATGCTAGTGGTT	XM_017598829.1
<i>Perk</i>	Forward: GGCTGGTGAGGGATGGTAAA Reverse: TTGGCTGTGTAACCTTGTGTCATCA	NM_031599.2
<i>Xbp1</i>	Forward: TCCGCAGCACTCAGACTACGT Reverse: ATGCCCAAAGGATATCAGACTC	NM_001271731.1
<i>Ho1</i>	Forward: ACAGCATACGTAAAGCGT CTCCA Reverse: CATGGCCTTCTGCGCAATCTTCTT	NM_012580.2
<i>Grp78</i>	Forward: TGAAGGGGAGCGTCTGATTG Reverse: TCATTCCAAGTGCGTCCGAT	NM_013083.2
<i>Chop</i>	Forward: TGGCACAGCTTGCTGAAGAG Reverse: TCAGGCGCTCGATTTCCT	NM_001109986.1
<i>Polr2a</i>	Forward: GCTGGACCTACTGGCATGTT Reverse: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	NM_001079162.5

6.4.6 Avaliação da atividade enzimática de SOD, glutathione transferase (GST) e Catalase

As amostras de placentas foram homogeneizadas com tampão fosfato de potássio (TFK) 50 nmol (pH7,0) e centrifugadas a 13.400 rpm a 4°C por 10 minutos para a coleta dos sobrenadantes. A concentração das proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (1976), enquanto as atividades enzimáticas de SOD, GST e Catalase foram avaliadas de acordo com Marklund and Marklund (1974), Habig et al. (1974) e Aebi (1984), respectivamente.

6.4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) e analisados pelo teste t de *Student* não pareado com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2 ®. Para as variáveis peso fetal e porcentagem de morte fetal foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 O hipotireoidismo materno compromete o desenvolvimento feto-placentário

A indução do hipotireoidismo foi confirmada pelas concentrações plasmáticas de T₃ e T₄ livres, que apresentaram redução nas ratas hipotireoideas no dia 0 de gestação quando comparadas ao grupo controle (Tabela 2). Aos 14 e 18 DG, o peso fetal no grupo hipotireoideo estava reduzido em relação ao controle ($P < 0,01$), como também foi observado no peso útero-placenta aos 18 DG, que foi menor nas ratas hipotireoideas quando comparado às do grupo controle ($P < 0,05$). Além disso, aos 18 DG, o hipotireoidismo aumentou a porcentagem de morte fetal (Tabela 2; $P < 0,05$).

Tabela 2: Dosagem plasmática de T₃ e T₄ livres no dia 0 de gestação e parâmetros reprodutivos das ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação.

Variável	Controle	Hipotireoideo
T3 livre	2,35 ± 0,11	1,84 ± 0,08*
T4 livre	1,18 ± 0,05	0,51 ± 0,12**
14 dias de gestação		
Peso útero+placenta/nºfetos (g)	0,455 ± 0,07	0,436 ± 0,05
Números fetos/fêmea	9,12 ± 1,06	7,28 ± 1,35
Peso fetal (g)	0,165 (0,14-0,18)	0,142 (0,08-0,16)**
% Morte fetal	0 (0 – 15,38%)	5 (0 - 20%)
18 dias de gestação		
Peso útero+placenta/nºfetos (g)	0,830 ± 0,04	0,69 ± 0,03*
Números fetos/fêmea	10,50 ± 0,99	9 ± 1,31
Peso fetal (g)	1,77 (1,39-2,35)	1,21 (1,04-1,58)**
%Morte fetal	0 (0-10%)	8 (0-40%)*

Diferenças significativas foram determinadas por teste *t* Student não pareado, exceto peso fetal e % de morte fetal que foram determinadas por teste de Mann-Whitney. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

6.5.2 O hipotireoidismo materno aumenta a expressão de HIF1 α e *Nrf2* na interface materno-fetal

Considerando que o hipotireoidismo compromete a migração trofoblástica intrauterina em ratas e a vascularização na placenta (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014) e que falhas na migração trofoblástica estão associadas com hipóxia na interface materno-fetal em mulheres pré-eclâmpticas (CHARNOCK-JONES, 2016; REDMAN; SARGENT; STAFF, 2014), procuramos avaliar inicialmente se o hipotireoidismo

materno poderia causar hipóxia na interface materno-fetal. Para isso, utilizamos a imunomarcção com HIF1 α , que é reconhecidamente utilizado para indicar a ocorrência de hipóxia (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017). O HIF1 α apresentou marcação discreta a moderada, citoplasmática e heterogênea na decídua e em células trofoblásticas da zona juncional (ZJ) e labirinto placentário (LP) no grupo hipotireoideo, tanto aos 14 quanto aos 18 DG, sendo que a imunomarcção no grupo controle foi ausente ou discreta (Figura 1A-B). A análise da área de imunomarcção demonstrou que as ratas hipotireoideas apresentaram maior expressão de HIF1 α na decídua e na ZJ aos 14 e 18 DG em relação ao controle (Figura 1C-D; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Com relação à expressão gênica de *Hif1 α* , não houve diferença significativa na decídua e placenta aos 14 DG entre os grupos (Figura 1E). No entanto, aos 18 DG, as ratas hipotireoideas apresentaram maior expressão de mRNA para *Hif1 α* na placenta em relação ao controle (Figura 1G; $P < 0,01$).

Além da avaliação de HIF1 α , também foi avaliada a expressão gênica de *Nrf2*, um fator de transcrição envolvido na expressão de enzimas antioxidantes em condições de hipóxia (FRANCISQUETI-FERRON *et al.*, 2019). A análise demonstrou que o hipotireoidismo, semelhante à expressão de *Hif1 α* , aumentou a expressão na placenta de transcritos de *Nrf2* no 18º DG quando comparado ao controle (Figura 1H, $P < 0,05$).

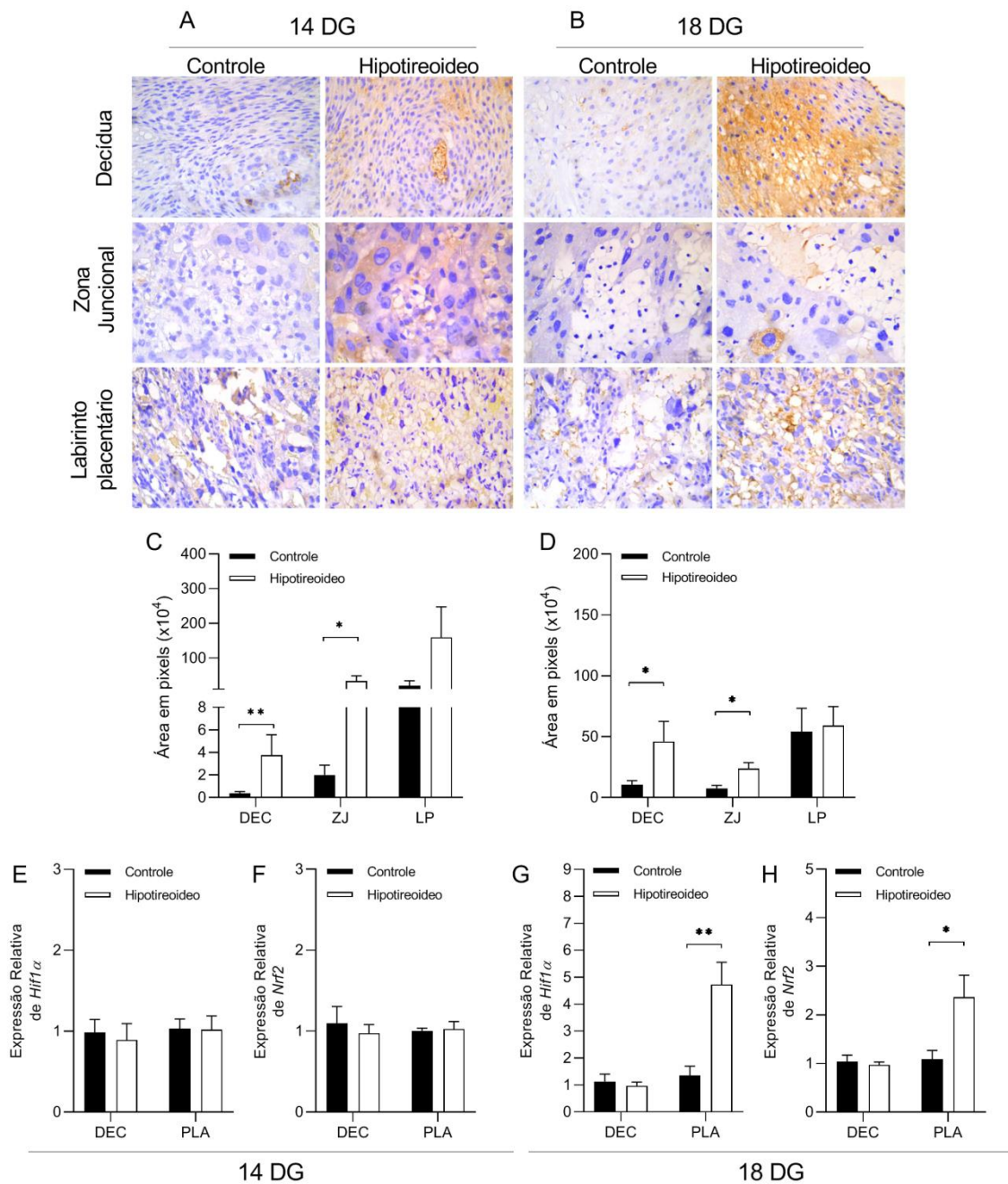


Figura 1-Expressão de HIF1 α e Nrf2 na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcagem de HIF1 α na decídua), zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). C-D) Área de imunomarcagem em pixels do HIF1 α na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Hif1 α* (E,G) e *Nrf2* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (E,F) e 18 (G,H) DG. (média $\pm$ SEM, * p <0.05; ** p <0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

6.5.3 O hipotireoidismo materno causa estresse oxidativo na interface materno-fetal

Visto que o hipotireoidismo aumentou a expressão de HIF1 α na interface materno-fetal, avaliamos a imunomarcação de 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que é um importante biomarcador de dano oxidativo endógeno ao DNA (URBANI AK et al., 2020). A imunomarcação foi citoplasmática e heterogênea na decídua, ZJ e LP, tanto aos 14 quanto aos 18 DG (Figura 2A-B), com marcação discreta a moderada no grupo hipotireoideo, e discreta ou ausente no controle. O hipotireoidismo aumentou a área de imunomarcação de 8-OHdG na ZJ e LP aos 14 DG e na região da decídua no 18º DG quando comparado ao controle (Figura 2C-D; $P < 0,05$; $P < 0,01$).

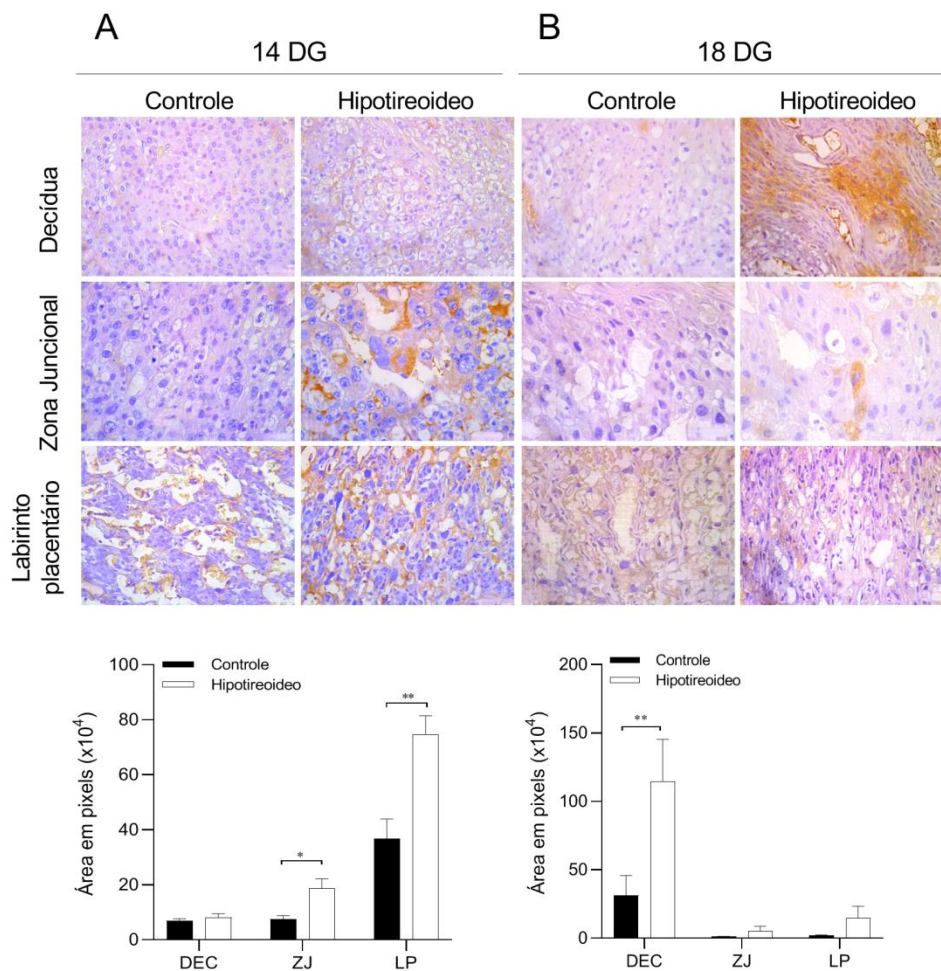


Figura 2-Expressão de 8-OHdG na decídua e placenta de ratos controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcação de 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). C-D) Área de imunomarcação em pixels do 8-OHdG na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG (média $\pm$ SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; DG= dias de

gestação.

6.5.4 O hipotireoidismo materno desregula a expressão de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal

Pelo fato de o hipotireoidismo ter aumentado a expressão de HIF1 α e 8-OHdG na interface materno-fetal das ratas, sugerindo uma condição de hipóxia e estresse oxidativo, e também de ter aumentado a expressão de *Nrf2*, um fator de transcrição envolvido na expressão de enzimas antioxidantes (FRANCISQUETI-FERRON *et al.*, 2019; ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; URBANIAK *et al.*, 2020), avaliamos a expressão de SOD1, SOD2, GPx1/2 e catalase na decídua e placenta dos animais deste estudo. A imunomarcagem de SOD1 foi citoplasmática e heterogênea e variou entre as regiões avaliadas, se mostrando discreta a moderada na região da decídua e moderada e intensa na ZJ e LP (Figura 3A-B), sendo que o hipotireoidismo aumentou a expressão proteica de SOD1 na decídua aos 14 DG (Figura 3C; $P < 0,05$), enquanto reduziu a expressão no LP aos 18 DG (Figura 3D; $P < 0,01$). Em relação à expressão gênica, o hipotireoidismo reduziu os transcritos de *Sod1* na placenta aos 14DG e de *Sod2* na decídua aos 18 DG, enquanto aumentou a expressão placentária de *Sod2* no mesmo período gestacional quando comparado ao controle (Figura 3E-H; $P < 0,05$).

A imunomarcagem de GPx1/2 foi citoplasmática e heterogênea e também variou entre as regiões da interface materno-fetal, sendo mais intensa na decídua e discreta a moderada na ZJ e LP (Figura 4A-B). Aos 14 DG, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem de GPx1/2 na ZJ em relação ao controle (Figura 4C; $P < 0,01$), além de haver uma tendência de aumento no LP ($P = 0,06$). No entanto, no mesmo período gestacional, as ratas hipotireoideas apresentaram menor expressão de mRNA de *Gpx1* na região da decídua quando comparadas ao controle (Figura 4D; $P < 0,05$). Aos 18 DG, embora não tenha sido observada diferença significativa na imunomarcagem nas regiões avaliadas, o hipotireoidismo aumentou a expressão de transcritos para *Gpx1* na placenta quando comparado ao controle (Figura 4F; $P < 0,05$).

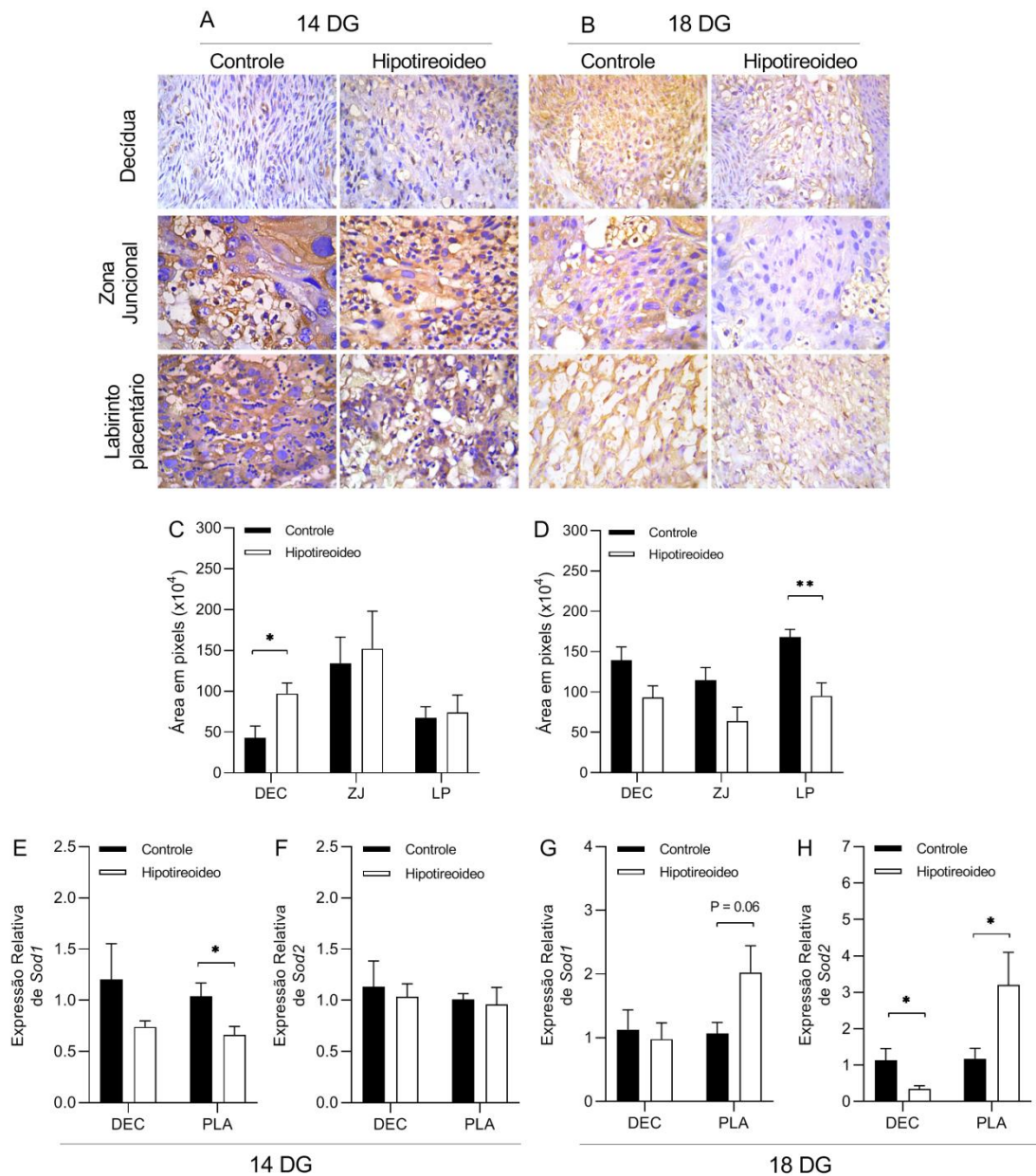


Figura 3-Expressão de SOD1 e Sod2 na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcagem de SOD1 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C-D) Área de imunomarcagem em pixels do SOD1 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Sod1* (E,G) e *Sod2* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (E,F) e 18 (G,H) DG. (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

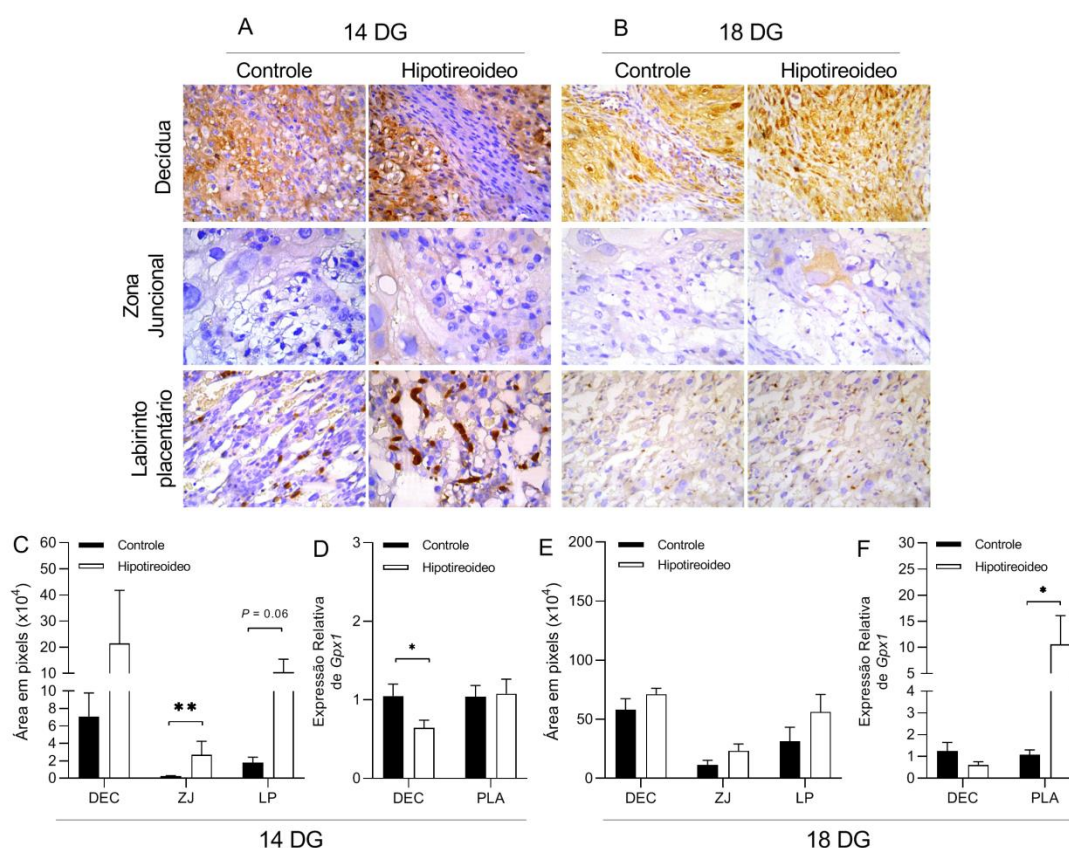


Figura 4-Expressão de GPx na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcagem de GPx1/2 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C,E) Área de imunomarcagem em pixels do GPx1/2 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. N,P) Expressão gênica relativa de *Gpx1* na decídua e placenta aos 14 (D) e 18 (F) DG. (média±SEM, *p<0.05; **p<0.01; Teste t de Student; N=6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

A imunomarcagem de CAT foi citoplasmática e heterogênea e apresentou expressão mais intensa na decídua e LP quando comparado à ZJ, que apresentou marcação nula ou fraca (Figura 5A-B). O hipotireoidismo não afetou a expressão proteica e gênica de catalase aos 14 DG (Figura 5C-D; $P > 0,05$). No entanto, aos 18 DG, as ratas hipotireoideas apresentaram redução da imunomarcagem de catalase na decídua e LP quando comparadas aos animais do grupo controle (Figura 5E; $P < 0,01$), como também da expressão gênica decidual ($P < 0,01$), enquanto houve aumento da expressão de mRNA na placenta (Figura 5F; $P < 0,01$).

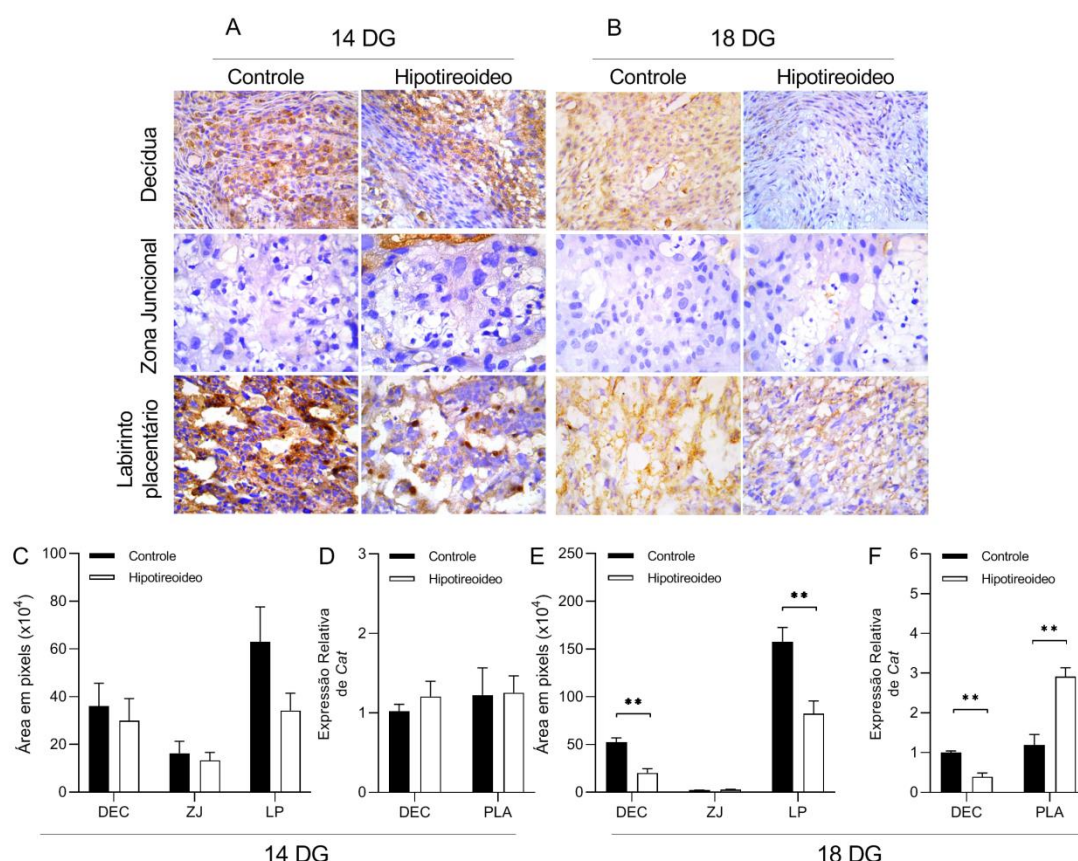


Figura 5-Expressão de catalase na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de catalase na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C,E) Área de imunomarcção em pixels de catalase na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. F,H) Expressão gênica relativa de *Cat* na decídua e placenta aos 14 (D) e 18 (F) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

6.5.5 O hipotireoidismo materno reduz a atividade enzimática placentária de SOD, catalase e GST no final da gestação

Considerando que o hipotireoidismo desregulou a expressão proteica e/ou gênica de SOD1, SOD2, catalase e GPx1 na interface materno-fetal das ratas deste estudo, avaliou-se a atividade enzimática de algumas dessas enzimas e da glutathione transferase (GST) na placenta. As ratas hipotireoideas apresentaram redução significativa da atividade enzimática de SOD, catalase e GST aos 18 DG quando comparadas às do grupo controle (Figura 6A-C; $P < 0,05$; $P < 0,01$), enquanto aos 14 DG houve aumento da atividade enzimática de GST no grupo hipotireoideo (Figura 6C; $P < 0,0001$).

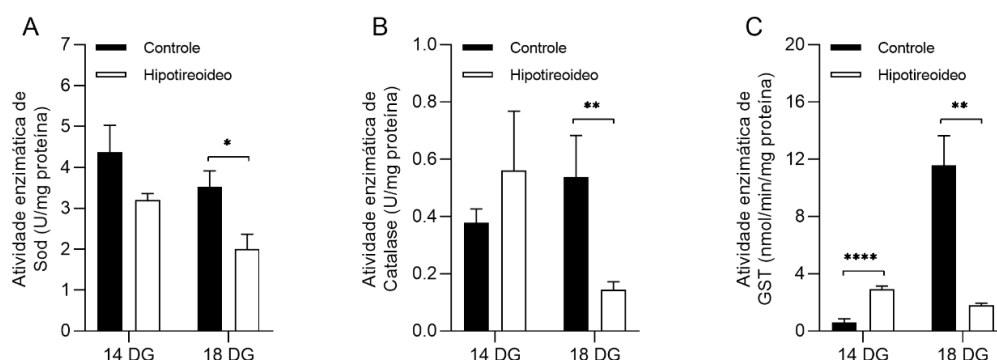


Figura 6- Atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta de ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A) Atividade enzimática de SOD (U/mg/proteína); B) atividade enzimática de catalase (U/mg/proteína); C) Atividade enzimática de GST (nmol/min/mg proteína); (média±SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo).

6.5.6 O hipotireoidismo materno desregula a expressão de mediadores da UPR e causa estresse reticular na interface materno-fetal

Pelo fato do estresse oxidativo estar associado à ocorrência de ERE (BHANDARY *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2020, 2021) e de outras doenças gestacionais como pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino apresentarem ERE na placenta (BURTON *et al.*, 2021; BURTON; YUNG, 2011), avaliou-se a expressão de diversos mediadores de ativação da UPR, desde as proteínas transmembrana PERK e ATF6, quanto sinalizadores intracelulares como ATF4, HO1, XBP1, GRP78 e CHOP. O hipotireoidismo reduziu a expressão gênica de *Perk* e *Atf6* na decídua e placenta aos 14 DG e *Atf6* na decídua aos 18 DG, enquanto aumentou a expressão placentária de mRNA de *Perk* e *Atf6* aos 18 DG quando comparado ao controle (Figura 7A-D; $P < 0,05$; $P < 0,01$).

A imunomarcagem de ATF4 foi citoplasmática, heterogênea e ausente a moderada nas três regiões avaliadas, decídua, ZJ e LP (Figura 8A-B), sendo que o hipotireoidismo reduziu a expressão no LP aos 14 DG (Figura 8C; $P < 0,05$), enquanto aumentou a imunomarcagem na decídua e ZJ aos 18 DG (Figura 8D; $P < 0,05$). Em relação à expressão de mRNA para *Ho1* e *Xbp1*, as ratas hipotireoideas apresentaram redução da expressão de ambos os genes na decídua aos 14 DG, como também ocorreu na placenta para *Ho1* na mesma idade gestacional (Figura 8E-F; $P < 0,05$). Aos 18 DG, não houve diferença significativa para os genes avaliados, tanto na decídua quanto na placenta (Figura 8G-H; $P > 0,05$).

A imunomarcagem de GRP78 foi fraca a moderada, citoplasmática e heterogênea na decídua, ZJ e LP (Figura 9A-B). Aos 14 DG, o hipotireoidismo aumentou a expressão de GRP78 na ZJ, enquanto reduziu a imunomarcagem no LP quando comparado ao controle

(Figura 9C; $P < 0,05$). Além disso, o hipotireoidismo reduziu a expressão placentária do mRNA para *Grp78* na mesma idade gestacional (Figura 9D; $P < 0,01$). Aos 18 DG, por outro lado, houve aumento da imunomarcagem de GRP78 na ZJ das ratas hipotireoideas em relação ao controle (Figura 9E; $P < 0,05$), enquanto não houve diferenças na expressão gênica na decídua e placenta na mesma idade gestacional (Figura 9F; $P > 0,05$).

A imunomarcagem de CHOP foi citoplasmática, heterogênea e fraca a intensa dependendo do grupo avaliado (Figura 10A-B). O hipotireoidismo aumentou a expressão proteica de CHOP tanto na decídua e ZJ aos 14 DG ($P < 0,05$), como também na decídua aos 18 DG ($P < 0,01$), com redução da imunomarcagem no LP no 14º dia (Figura 10C-E; $P < 0,05$). Em relação à expressão gênica, embora tenha ocorrido redução da expressão de *Chop* na placenta das ratas hipotireoideas no 14º DG, o hipotireoidismo aumentou a expressão placentária do mRNA no 18º DG (Figura 10D-F; $P < 0,05$).

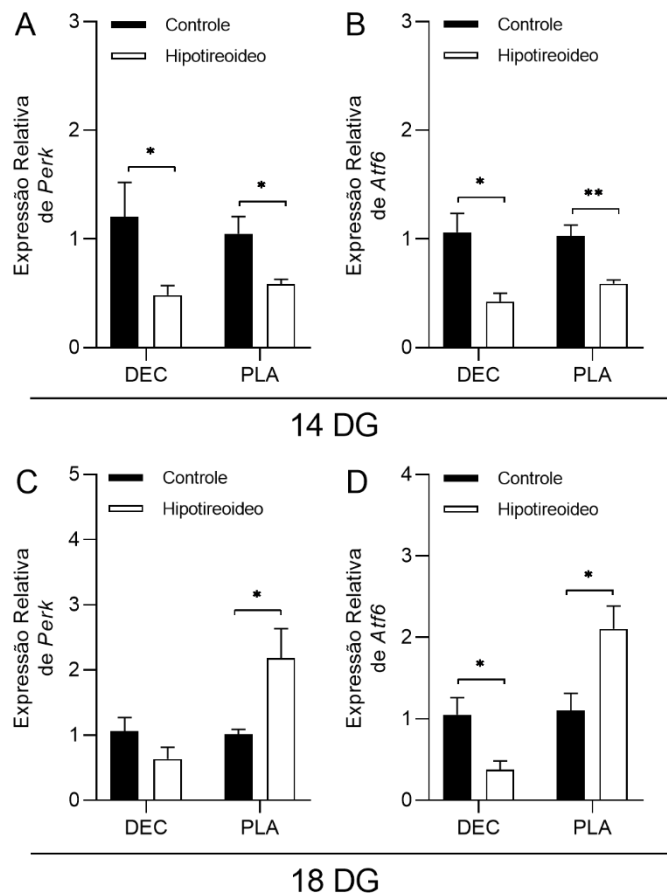


Figura 7-Expressão de *Atf6* e *Perk* na decídua e placenta de ratas controle e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-D) Expressão gênica relativa do *Perk* (A,C) e *Atf6* (B,D) na placenta e decídua aos 14 (A,B) e 18 (C,D) DG (média±SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo) DEC= decídua; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

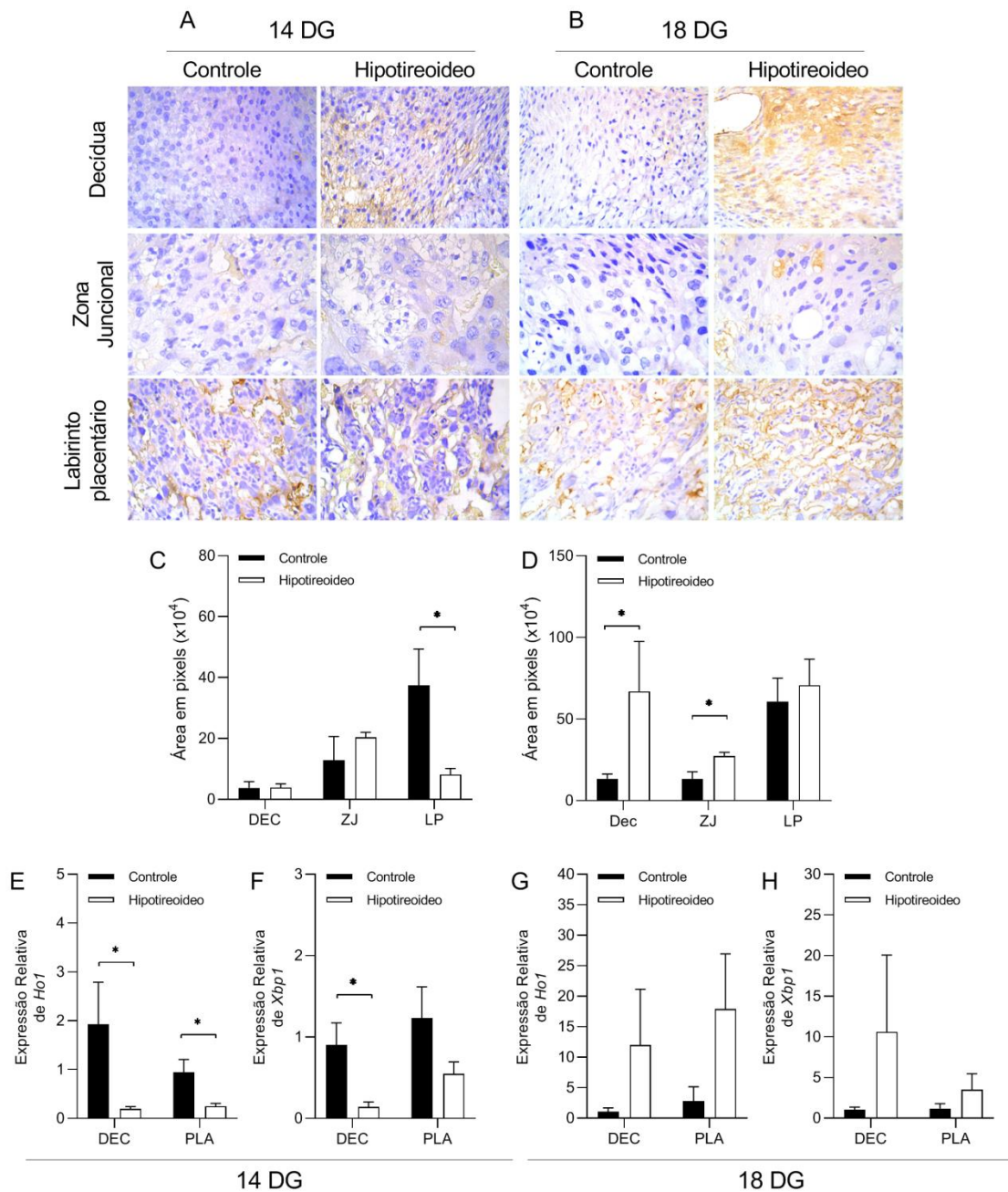


Figura 8-Expressão de ATF4, *Ho1* e *Xbp1* na decídua e placenta de ratas controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de ATF4 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C-D) Área de imunomarcção em pixels do ATF4 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (D) DG. E-H) Expressão gênica relativa de *Ho1* (E,G) e *Xbp1* (F,H) na decídua e placenta aos 14 (O,P) e 18 (Q,R) DG. (média±SEM, *p<0.05; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

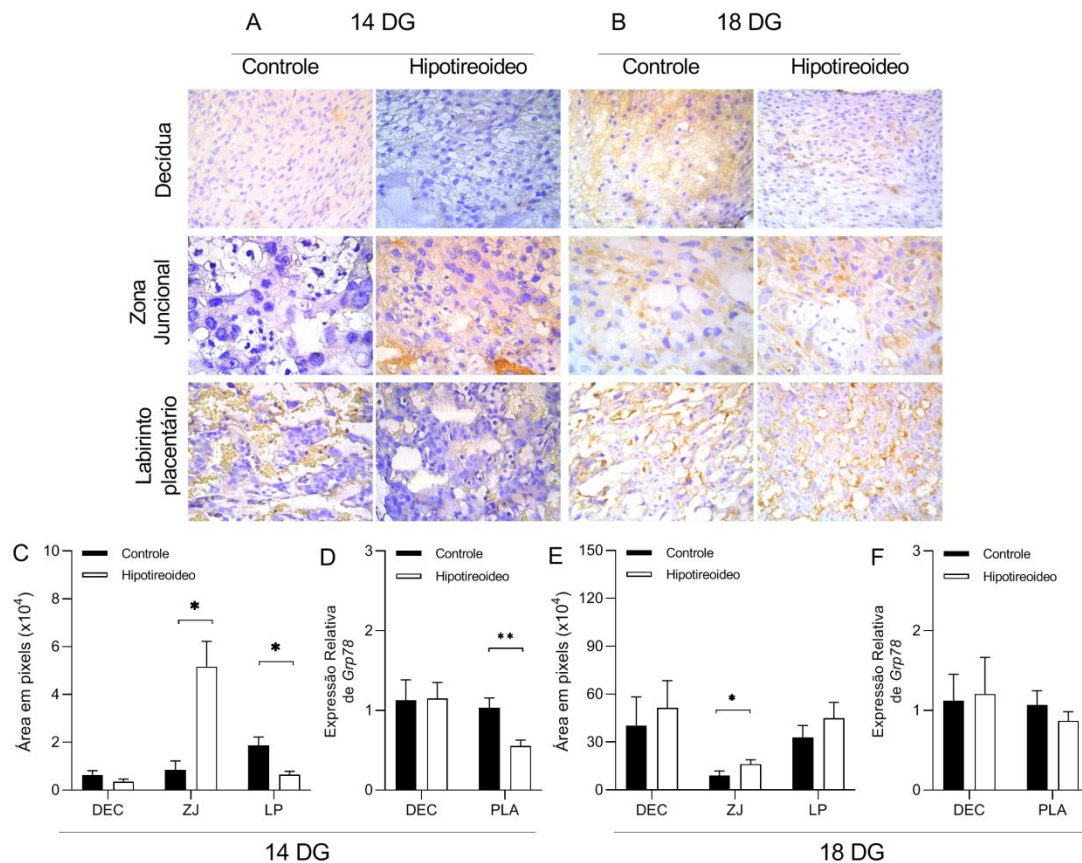


Figura 9-Expressão de GRP78 na decídua e placenta de ratos controles e hipotireoideas aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcção de GRP78 na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C,E) Área de imunomarcção em pixels de GRP78 na decídua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. D,F) Expressão gênica relativa de *Grp78* na decídua e placenta aos 14 (N) e 18 (P) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

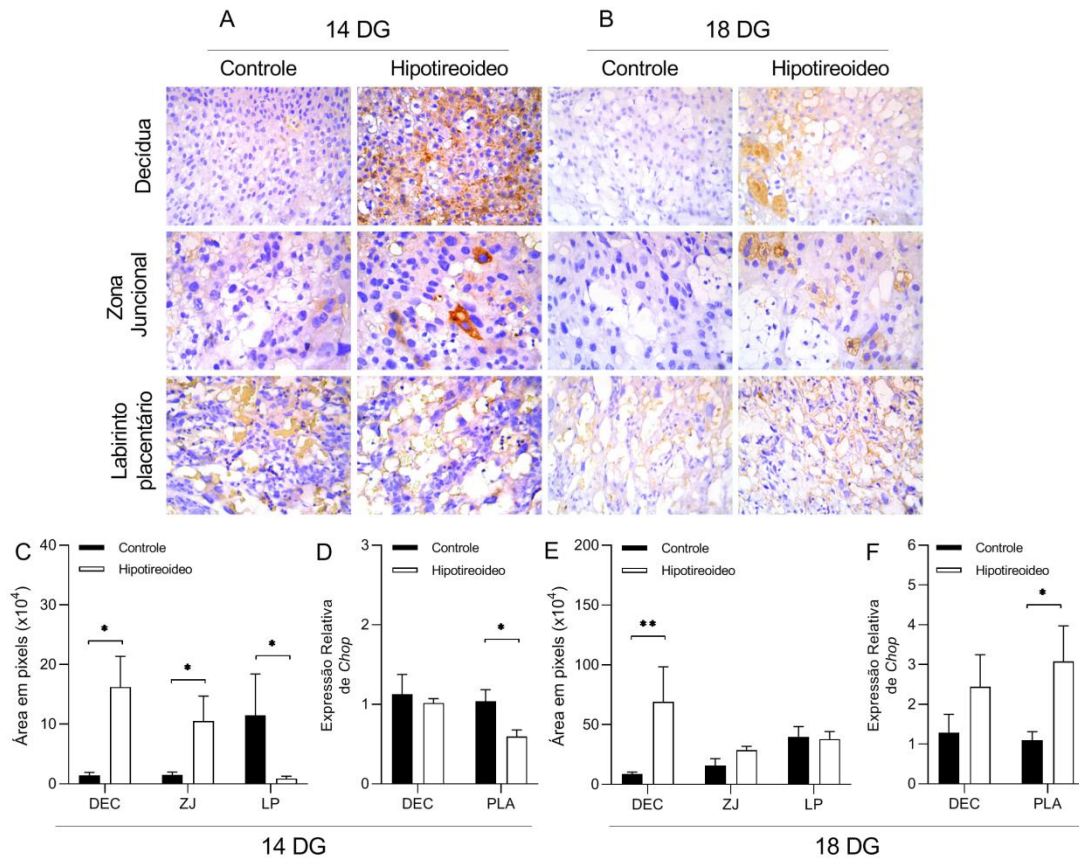


Figura 10-Expressão de CHOP na decidua e placenta de ratos controles e hipotireoideias aos 14 e 18 dias de gestação. A-B) Fotomicrografias da imunomarcagem de CHOP na decidua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50µm). C,E) Área de imunomarcagem em pixels de CHOP na decidua, zona juncional e labirinto placentário aos 14 (C) e 18 (E) DG. D,F) Expressão gênica relativa de *Chop* na decidua e placenta aos 14 (N) e 18 (P) DG. (média±SEM, **p<0.01; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decidua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário; PLA= placenta; DG= dias de gestação.

6.6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a restrição de crescimento feto-placentária observada em ratas com hipotireoidismo materno está associada com o aumento de Hif1α e de 8-OHdG na interface materno-fetal e uma desregulação na expressão placentária e decidual de mediadores da UPR e enzimas antioxidantes, sugerindo que a disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo está associada a hipóxia, estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal.

A redução do peso fetal e da unidade útero-placenta causada pelo hipotireoidismo nas ratas aos 14 e/ou 18 dias de gestação, como também observado por Silva *et al.*(2012), e o aumento da morte fetal no 18º dia, foram associados à maior expressão placentária e decidual

de HIF1 α , tanto em nível proteico quanto gênico, sugerindo um ambiente de hipóxia na interface materno-fetal desses animais. O HIF1 α é reconhecidamente utilizado como um biomarcador de hipóxia celular (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017) e estudos prévios tinham sugerido a ocorrência desse insulto na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas, uma vez que demonstraram redução da migração trofoblástica intrauterina e da expressão de MMP2 e 9 na placenta desses animais (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014). Falhas na migração trofoblástica comprometem o remodelamento das artérias espiraladas uterinas e, conseqüentemente, o aporte sanguíneo para a interface materno-fetal (APLIN *et al.*, 2020; FISHER, 2015), sendo que a pré-eclâmpsia, o aborto espontâneo e a restrição de crescimento intrauterino, importantes doenças gestacionais, também apresentam as mesmas alterações placentárias e aumento de HIF1 α e hipóxia placentária (ALI *et al.*, 2021; KIMBALL *et al.*, 2015; SHAHNAWAZ *et al.*, 2021; TIANHONG; PHUPONG, 2021).

É plausível que a maior expressão de HIF1 α na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas no presente estudo esteja envolvida no estresse oxidativo observado na placenta e decídua desses animais, como evidenciado pela maior expressão proteica de 8-OHdG, um indicador de dano oxidativo ao DNA (URBANIAK *et al.*, 2020). Owaki *et al.* (2019) também verificaram aumento da expressão proteica de HIF1 α e 8-OHdG em placentas de mulheres com hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia, como também foi demonstrado recentemente por Kumar *et al.* (2021) na placenta de mulheres que faziam uso de tabaco.

Concomitante ao aumento de HIF1 α e 8-OHdG, também foi observado no presente estudo o aumento da expressão gênica de *Nrf2* na placenta das ratas hipotireoideas aos 18 dias de gestação. O NRF2 é um importante fator transcricional associado à ativação de enzimas antioxidantes para o controle do estresse oxidativo e apoptose (FRANCISQUETI-FERRON *et al.*, 2019; LOBODA *et al.*, 2016), sendo que o aumento nos níveis de mRNA de *Nrf2* também foi observado por Qi *et al.* (2020) em um estudo *in vitro* de estresse oxidativo com células trofoblásticas HTR8/SVneo que foram tratadas com curcumina, um potente antioxidante exógeno. Por outro lado, a inibição da sinalização de NRF2 foi associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio durante a embriogênese de rato que apresentava defeitos do tubo neural induzidos por ácido retinoico (LIU *et al.*, 2018). Assim, o aumento de *Nrf2* no presente estudo pode ser reflexo da ocorrência de estresse oxidativo, visto que os sistemas biológicos ativam vias antioxidantes no intuito de proteger o organismo contra o excesso de espécies reativas de oxigênio produzidas em situações de hipóxia e/ou de estresse oxidativo (QI *et al.*,

2020).

Paralelamente ao aumento do *Nrf2*, observamos o aumento da imunomarcção de SOD1 e GPx1/2 na decídua e zona juncional das ratas hipotireoideas aos 14 dias de gestação, respectivamente, assim como dos genes *Sod2*, *Gpx1* e *Cat* na placenta aos 18 dias de gestação e da atividade enzimática placentária de GST no 14º dia de gestação. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que também mostraram aumento da expressão de SOD1, SOD2 e catalase na placenta de ratas espontaneamente hipertensas (BLOIS *et al.*, 2021), como também para *Cat* e *glutathione reductase (Grs)* na placenta de mulheres com diabetes mellitus gestacional (LAPPAS *et al.*, 2011).

Contudo, as ratas hipotireoideas apresentaram redução significativa da atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta aos 18 dias de gestação, como também da imunomarcção de SOD1 e catalase na decídua e/ou placenta e da expressão gênica decidual de *Sod2* e *Cat*. A baixa atividade de enzimas antioxidantes também foi verificada por Zejnullahu *et al.* (2021) na placenta e no plasma de mulheres com aborto recorrente. A redução observada no presente estudo da atividade enzimática e da expressão gênica e/ou proteica de enzimas antioxidantes possivelmente está relacionada ao fato de o hipotireoidismo reduzir a capacidade antioxidante sistêmica e assim os animais ficam mais suscetíveis aos danos oxidativos (MISHRA *et al.*, 2019). Além disso, a redução da atividade das enzimas antioxidantes pode ser reflexo da redução da síntese ou do aumento do consumo ocasionado pelos altos níveis de espécies reativas de oxigênio (AOUACHE *et al.*, 2018). Porém, mais estudos são necessários para esclarecer esses achados.

Pelo fato do estresse oxidativo estar associado à ocorrência de estresse de retículo endoplasmático, avaliou-se também a expressão de diversos mediadores envolvidos na ativação da UPR. Curiosamente, o hipotireoidismo causou uma redução da expressão gênica placentária e/ou decidual de *Atf6*, *Perk*, *Xbp1*, *Ho1*, *Grp78* e *Chop* e da imunomarcção de ATF4 aos 14 dias de gestação, período que corresponde ao início da invasão trofoblástica intrauterina na rata (SILVA; SERAKIDES, 2016). A menor expressão de mediadores da UPR, como observado no presente estudo nas ratas hipotireoideas, pode comprometer o sucesso gestacional, pois falhas na ativação da UPR estão associadas às disfunções placentárias por afetarem a diferenciação, invasão, migração, angiogênese e apoptose celular (YUNG *et al.*, 2008; BURTON *et al.*, 2009; LYALL *et al.*, 2013; GUZEL *et al.*, 2017; BASTIDA-RUIZ *et al.*, 2019; YOSHIDA *et al.*, 2021).

Redução na expressão de mediadores da UPR pode ocasionar falhas na angiogênese e na vasculogênese placentárias, por comprometer a expressão do fator de crescimento do

endotélio vascular (VEGF)(GHOSH *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2012, 2015) demonstraram que o hipotireoidismo materno reduz a expressão de VEGF placentário, sendo que a sinalização IRE1 α /XBP1, ATF6 α e PERK/ATF4, bem como o HO1, estão envolvidos na regulação da expressão do VEGF (GEORGE *et al.*, 2013, 2017; GHOSH *et al.*, 2010; IWAWAKI *et al.*, 2009; OWAKI *et al.*, 2019). Além disso, PERK e HO1 estão associados à regulação da invasão trofoblástica (LEE *et al.*, 2019; OLTRA *et al.*, 2020), sugerindo que redução na expressão desses fatores pode resultar em falhas nesse processo e, consequentemente, na remodelação da artéria espiralada uterina. A menor expressão de *Grp78* e *Chop* causada pelo hipotireoidismo aos 14 dias pode também comprometer a fusão, sincicialização e invasão das células trofoblásticas (ARNAUDEAU *et al.*, 2009; BASTIDA-RUIZ *et al.*, 2019, 2020; FRADET *et al.*, 2012), como também reduzir a apoptose, processo crucial durante o remodelamento das artérias espiraladas (HARRIS, 2011; SILVA; SERAKIDES, 2016; WHITLEY; CARTWRIGHT, 2009).

No entanto, maior expressão proteica decidual e/ou placentária de ATF4, GRP78 e CHOP foi observada tanto aos 14 quanto aos 18 dias de gestação nas ratas hipotireoideas, e um aumento da expressão gênica placentária de *Perk*, *Atf6* e *Chop* no 18º dia de gestação. GRP78 e CHOP são reconhecidamente utilizados como marcadores de ativação de estresse de retículo endoplasmático (RON; HARDING, 2012; WANG; KAUFMAN, 2016) e estudos prévios em placentas de ratas submetidas à hipóxia mostraram um aumento da expressão proteica de GRP78 e ATF4 ao final da gestação (NUZZO *et al.*, 2018). Corroborando com os nossos resultados, Du *et al.* (2016) também demonstraram aumento da expressão proteica placentária de GRP78 e CHOP na placenta de mulheres com pré-eclâmpsia, enquanto Mizuuchi *et al.*(2016) observaram um aumento de mRNA para *Atf6* e *Atf4*. Maior expressão proteica e/ou gênica para PERK, ATF6, ATF4, GRP78 e CHOP também foi demonstrada na placenta de ratas expostas a nicotina, sugerindo ativação de estresse de retículo endoplasmático (WONG *et al.*, 2015).

O estresse de retículo endoplasmático é ativado por uma série de eventos como hipóxia e redução de ATP, glicose e Ca²⁺(BURTON; YUNG, 2011), sendo que recentemente foi demonstrado que o hipotireoidismo em ratas gestantes também causa intolerância à glicose (KENT; ATLURI; CUFFE, 2021), sugerindo outro meio pelo qual pode ocorrer ativação de estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal desses animais. Além disso, a ativação crônica e acentuada de estresse de retículo endoplasmático está associada à ocorrência de apoptose (DU *et al.*, 2016), sendo que um estudo prévio desenvolvido por Silva *et al.*(2012) demonstrou aumento da apoptose na placenta de ratas com hipotireoidismo

materno.

Os achados deste estudo demonstraram que a restrição feto-placentária em ratas com hipotireoidismo materno está associada não somente com uma desregulação na expressão placentária e decidual de mediadores da UPR e redução da atividade de enzimas antioxidantes, como sugerem hipóxia e ativação de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático na interface materno-fetal desses animais. Isto expande o nosso conhecimento sobre a patogênese da disfunção feto-placentária causada pelo hipotireoidismo materno e sugere novas vias para o estabelecimento de estratégias terapêuticas para essa doença gestacional.

7 CAPÍTULO 3

**TRATAMENTO COM PORFIRINAS DE MANGANÊS BLOQUEIA O ESTRESSE
PLACENTÁRIO CAUSADO PELO HIPOTIREOIDISMO MATERNO E MELHORA
A MORFOGÊNESE PLACENTÁRIA E O DESENVOLVIMENTO FETAL EM UM
MODELO MURINO**

**Manganese porphyrin-based treatment blocks placental stress caused by maternal
hypothyroidism and improves placental morphogenesis and fetal development in murine model**

7.1 RESUMO

O estresse oxidativo (EO) e o estresse de retículo endoplasmático (ERE) estão na gênese das disfunções placentárias observadas na pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino e hipotireoidismo materno. Nesse sentido, as porfirinas de manganês (MnPs) têm apresentado alto potencial antioxidante e anti-inflamatório, embora não tenham sido avaliadas em doenças gestacionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico de duas MnPs, MnIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIT5B3EPyP (MnP II), na disfunção feto-placentária de ratas hipotireoideas. O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil e o tratamento com as MnPs I e II iniciou-se no 8º dia de gestação (DG). O desenvolvimento feto-placentário, a bioquímica plasmática e a expressão placentária e decidual de mediadores antioxidantes (SOD1, CAT, GPx1, GST), de hipóxia (HIF1 α), de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG), de ERE (GRP78 e CHOP), imunológicos (TNF α e IL-10) e angiogênicos (VEGF) foram avaliados no 18º DG. As MnPs I e II aumentaram o peso fetal das ratas hipotireoideas, além da MnP I aumentar o peso dos órgãos fetais. As MnPs restabeleceram a morfologia da zona juncional nas ratas hipotireoideas e aumentaram a vascularização na placenta. As MnPs bloquearam o aumento de mediadores de EO e ERE causado pelo hipotireoidismo, mostrando níveis de expressão de HIF α , 8-OHdG, Gpx1, Grp78 e Chop semelhante ao controle, além de terem aumentado a expressão proteica de SOD1, Cat e GPx1 e restaurado a expressão de IL-10 e VEGF na decídua e/ou placenta. No entanto, as MnPs não restauraram a baixa atividade enzimática placentária de SOD, CAT e GST causada pelo hipotireoidismo, enquanto aumentaram a expressão decidual e placentária de TNF α . Conclui-se que o tratamento com as MnPs melhora o desenvolvimento feto-placentário de ratas hipotireoideas e protege contra o estresse oxidativo e de retículo endoplasmático causado pelo hipotireoidismo na interface materno-fetal, além de restaurar a expressão placentária e/ou decidual de IL-10 e VEGF.

Palavras-chave: tireoide; metaloporfirina; antioxidante; placenta; antiinflamatório; rata.

7.2 ABSTRACT

Oxidative stress (OS) and endoplasmic reticulum stress (ERS) are at the genesis of placental disorders observed in pre-eclampsia, intrauterine growth restriction and maternal hypothyroidism. In this sense, manganese porphyrins (MnPs) have shown high antioxidant and anti-inflammatory potential, although they have not been evaluated in gestational diseases. The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of two MnPs, MnIIIT2EPyP (MnP I) and MnIIIT5B3EPyP (MnP II), in the fetal-placental dysfunction of hypothyroid rats. Hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil and treatment with MnPs I and II started on the 8th day of pregnancy (DG). Fetoplacental development, plasma biochemistry and placental expression of antioxidant mediators (SOD1, CAT, GPx1, GST), hypoxia (HIF1 α), oxidative DNA damage (8-OHdG), ERS (GRP78 and CHOP), immunological (TNF α and IL-10) and angiogenic (VEGF) were evaluated on the 18th DG. MnPs I and II increased fetal weight in hypothyroid rats, and MnP I increased fetal organ weight. MnPs restored the junctional zone morphology in hypothyroid rats and increased placental vascularization. MnPs blocked the increase of OS and ERS mediators caused by hypothyroidism, showing similar levels of expression of HIF α , 8-OHdG, Gpx1, Grp78 and Chop to the control, in addition to increasing the protein expression of SOD1, Cat and GPx1 and restoring the expression of IL-10 and VEGF in the decidua and/or placenta. However, MnPs did not restore the low placental enzyme activity of SOD, CAT and GST caused by hypothyroidism, while increasing the decidual and placental expression of TNF α . It is concluded that treatment with MnPs improves the fetal-placental development of

hypothyroid rats and protects against oxidative stress and endoplasmic reticulum stress caused by hypothyroidism at the maternal-fetal interface, in addition to restoring placental and/or decidual expression of IL-10 and VEGF.

Keywords: thyroid; metalloporphyrin; antioxidant; placenta; anti-inflammatory; rat.

7.3 INTRODUÇÃO

Doenças gestacionais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, aborto recorrente e diabetes mellitus gestacional estão associadas à ocorrência de estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal (BURTON *et al.*, 2009, 2021; BURTON; YUNG, 2011; FOLLI *et al.*, 2012; GIACCO; BROWNLEE, 2010; LIAN *et al.*, 2011; YUNG *et al.*, 2008). Recentemente, demonstramos que o hipotireoidismo materno, outra importante doença gestacional que afeta 2,5 até 15% das mulheres gestantes, dependendo da região (IDRIS *et al.*, 2005; ZHANG; DONG; SU, 2016), também causa estresse oxidativo e reticular na interface materno-fetal de ratas, com desregulação e redução da atividade de enzimas antioxidantes na decídua e placenta e aumento de mediadores de estresse reticular ao final da gestação (SANTOS *et al.*, 2021a).

Estudos já demonstraram que o hipotireoidismo aumenta a frequência de abortos espontâneos (LONGCOPE; C., 1991; THANGARATINAM *et al.*, 2011), está associado à ocorrência de pré-eclâmpsia (KURLAK *et al.*, 2013; LARIJANI *et al.*, 2009) e origina neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (KRASSAS, 2000; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Além disso, em ratas, o hipotireoidismo materno também resultou em falhas na migração trofoblástica intrauterina, apoptose e redução da proliferação trofoblástica e da expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos na interface materno-fetal, como interleucina 10 (IL-10), óxido nítrico sintase induzível 2 (NOS2), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento placentário (PIGF) (SILVA *et al.*, 2012, 2014, 2015).

Como os hormônios tireoidianos são importantes reguladores do consumo de oxigênio e de antioxidantes no organismo (MENG *et al.*, 2016; SAHOO *et al.*, 2008), sendo que a hipofunção tireoidiana compromete a atividade antioxidante e o metabolismo lipídico (CHAKRABARTI *et al.*, 2016; MANCINI *et al.*, 2016), o uso de antioxidantes sintéticos ou naturais no tratamento da disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno pode ser promissor, como também na prevenção de outras doenças gestacionais que apresentam o estresse oxidativo e reticular em sua patogênese, como a pré-eclâmpsia e o aborto recorrente (AOUACHE *et al.*, 2018; HANSSON; NÄÄV; ERLANDSSON, 2015). Neste sentido, nos

últimos anos, estudos têm demonstrado que porfirinas de manganês (MnPs) apresentam grande potencial terapêutico no controle do estresse oxidativo em modelos de acidente vascular cerebral, isquemia renal e radioproteção pelo fato de apresentarem alto poder antioxidante e mínima toxicidade, além da alta biodisponibilidade devido à sua lipofilicidade (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012; CHATTERJEE *et al.*, 2020). Ademais, foi verificado que as MnPs também apresentam ação anti-inflamatória ao afetarem as respostas imunes de linfócitos T helper 1 (Th1) e 2 (Th2), reduzindo citocinas como interferon gamma (IFN γ) e interleucinas 4(IL-4)e 5(IL-5) (JUNGSUWADEE *et al.*, 2012). No entanto, até o momento, nenhum estudo foi realizado com MnPs para o tratamento de doenças gestacionais que cursam com estresse placentário.

As MnPs são metaloporfirinas, no qual seu anel porfirínico tem a capacidade de ser alterado. Como exemplos temos as MnTE-2-PyP 5+, MnTM-2-PyP 5+, MnTnBu-2-PyP 5+, MnTnHex-2-PyP 5+ e MnTnBuOE-2-PyP 5+ (BATINIC-HABERLE *et al.*, 2012, 2014; BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009; OLSON *et al.*, 2020; SHRISHRIMAL *et al.*, 2020a). Essas porfirinas são capazes de regular fatores de transcrição, como o fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF1 α) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), que são dependentes de redox, e suprimir processos inflamatórios mediados por estresse oxidativo (BOTTINO *et al.*, 2004; GAUTER-FLECKENSTEIN *et al.*, 2010).

Dessa forma, como o hipotireoidismo causa estresse oxidativo e reticular na interface materno-fetal de ratas (SANTOS *et al.*, 2021a), a hipótese deste estudo é que as MnPs podem impedir ou reduzir as alterações feto-placentárias causadas pelo hipotireoidismo materno. Assim, o objetivo foi avaliar o potencial terapêutico de duas formulações de MnPs, MnIIIT2EPyP e MnIIIT5B3EPyP, na restrição feto-placentária de ratas com hipotireoidismo. Os achados demonstraram que as duas MnPs avaliadas, sendo a MnIIIT5B3EPyP ainda não descrita na literatura, foram capazes de melhorar o desenvolvimento fetal e a morfologia e vascularização placentária de ratas com hipotireoidismo. Esse efeito foi associado a uma redução do estresse oxidativo e reticular, aumento da expressão de enzimas antioxidantes e restauração da expressão de HIF1 α , IL-10 e VEGF na interface materno-fetal.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Delineamento experimental

Ratas Wistar adultas (230-250g) foram utilizadas neste estudo. As fêmeas foram alimentadas com ração comercial e água *ad libitum* e mantidas em regime de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (22 °C) controladas.

Após 7 dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em grupos controle, MnP I e MnP II (Experimento 1), e nos grupos controle, hipotireoideo, hipo+MnPI e hipo+MnPII (Experimento 2). Cada grupo foi composto por 7 a 8 animais.

O primeiro experimento foi realizado para verificar se a administração das MnPs poderia comprometer o desenvolvimento feto-placentário, uma vez que até o momento não tinham sido utilizadas durante a gestação. O ciclo estral das ratas foi então monitorado diariamente e após a verificação de dois ciclos estrais completos (proestro, estro, diestro), as ratas foram colocadas com ratos machos adultos por 12 horas durante a noite. Na manhã seguinte, esfregaços vaginais foram realizados e as cópulas foram confirmadas pela presença de espermatozoides nas citologias vaginais. Esse dia foi designado como dia 0 de gestação e a eutanásia ocorreu no 18º dia de gestação (DG).

No experimento 2, os animais receberam diariamente, por sonda orogástrica, durante todo o experimento, 6-propil-2-tiouracil (PTU; 4mg/Kg/dia) em água destilada (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014) para indução do hipotireoidismo. Após três dias do início da indução, as fêmeas de todos os grupos foram submetidas à citologia vaginal e manejo reprodutivo conforme o experimento 1. As ratas que tiveram o diagnóstico de gestação confirmado foram mantidas separadas de acordo com o grupo experimental. As eutanásias foram realizadas no dia 0 de gestação, para dosagem de T3 e T4 livres e confirmação do hipotireoidismo, e no 18º dia para coleta dos discos placentários. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (Protocolo nº 002/17)

7.4.2 Administração das porfirinas de manganês (MnPs)

Para o experimento 1, os grupos tratados com MnPs (Figura 1) eram formados pelo grupo MnP I ([MnIIIT2EPyP]5+ (5,10,15,20-tetraquis (2- etilpiridil) porfirinatomanganês (III)) e grupo MnP II ([MnIIIT5b3EPyP]5+(5,10,15,20-tetraquis(5-bromo-3-etilpiridil)porfirinatomanganês(III)). No experimento 2, foram formados os grupos hipotireoideo (PTU) + MnPI e hipotireoideo (PTU) + MnPII. A MnPI possui atividade antioxidante já descrita em outras doenças (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009), mas ainda não foi avaliada em doenças gestacionais. Ela foi utilizada como referência para a avaliação da MnPII, uma nova metaloporfirina sem estudos *in vitro* e *in vivo* sobre sua atividade antioxidante e potencial terapêutico. O tratamento com as MnPs foi diário, do 8º ao 18º DG. A terapêutica foi iniciada no período pós-implantação e início do processo de placentação (SILVA; SERAKIDES, 2016) para que não houvesse a possibilidade de a droga afetar a

implantação embrionária. As drogas foram diluídas em solução fisiológica estéril e a dose administrada foi de 0,1 mg/Kg/dia, por via intra-peritoneal (IP) (BATINIĆ-HABERLE *et al.*, 2009).

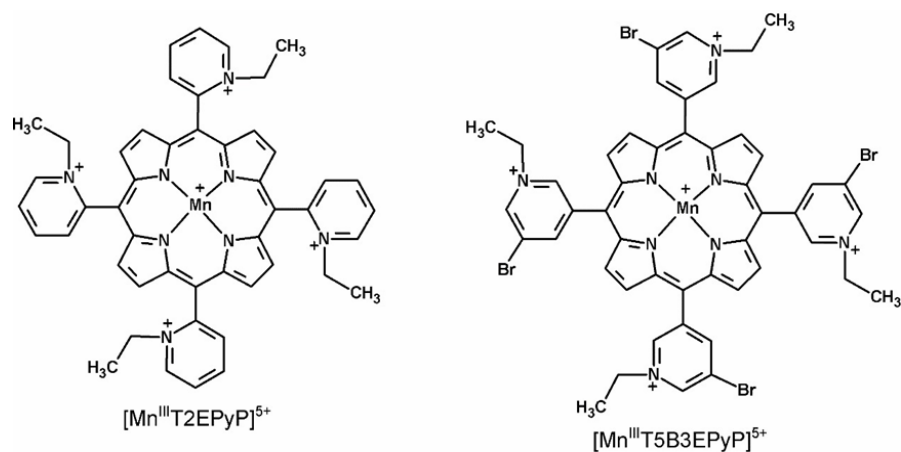


Figura 1-Estrutura química das MnPs.

7.4.3 Necropsia e coleta de material

As ratas foram eutanasiadas com guilhotina e 5 mL de sangue foram coletados em tubos com heparina para obtenção do plasma. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos e o plasma obtido foi armazenado a -20 °C.

Os úteros contendo as placentas e os fetos foram separados das tubas uterinas e dos ovários. Posteriormente, foram pesados os úteros contendo as placentas e os fetos, os úteros com placentas e cada feto individualmente, bem como também foram separados e pesados individualmente os órgãos dos fetos (fígado, coração, rins, pulmões). O valor do peso do líquido amniótico foi estimado subtraindo o peso da placenta e o peso dos fetos. Foram também contabilizados o número de fetos e o número de sítios com reabsorção ou morte fetal, que posteriormente foram excluídos das outras análises. Depois, foram retirados, de forma aleatória, oito discos placentários de ambos os cornos de cada animal. Dois discos placentários foram retirados, dissecados e separados das decíduas. Um dos discos foi acondicionado em microtubos, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente estocado a -80°C para avaliação da atividade de enzimas antioxidantes. O outro disco placentário e as decíduas foram armazenados individualmente em criotubos contendo Trizol, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80 °C para posterior realização de qPCR. Os seis discos restantes foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas e processados pela técnica de inclusão em parafina para análise

histomorfométrica e imuno-histoquímica. Os tecidos foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool (70% até 100%), com posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4µm de espessura dos tecidos foram obtidos por microtomia em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina para avaliação histomorfométrica. Para imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

7.4.4 Análise histomorfométrica da placenta

A avaliação histomorfométrica foi realizada em 6-7 discos placentários/grupo. Para isso, os cortes histológicos foram realizados no centro do disco placentário de forma que incluísse o vaso sanguíneo materno central de modo que houvesse uma uniformização entre eles. Imagens de cada disco placentário foram capturadas utilizando um estereomicroscópio *Leica S9i* e a espessura de cada camada da placenta (zona juncional (ZJ) e labirinto placentário (LP)) foi avaliada em 10 regiões aleatórias com obtenção da 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.

Na ZJ foi avaliada a proporção de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes trofoblásticas em cinco campos aleatórios no aumento de 200x. No LP foi avaliada a proporção de área ocupada por seio vascular materno, capilares fetais e mesênquima fetal/células trofoblásticas em cinco campos aleatórios no aumento de 400x. As imagens foram capturadas em um Microscópio fotônico *Leica DM2500* e a quantificação foi realizada em grátula de 99 (ZJ) e 100 (LP) pontos com auxílio do software *Image Pro Plus®* versão 4.5 (SILVA *et al.*, 2012).

7.4.5 Imuno-histoquímica(IHQ)

Cortes histológicos da placenta com a decídua basal + triângulo metrial foram submetidos à análise imuno-histoquímica. Os anticorpos utilizados foram anti-HIF1α (1:1000, sc-13515, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-8OHdG (1:200, sc-393871, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-SOD1 (1:1000, sc-365858, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GPx1/2 (1:1000, sc-133160, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-catalase (1:1000, sc-271803, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-ATF4 (1:1000, sc-390063, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GRP78 (1:1000, sc-13539, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CHOP (1:1000, sc-71136, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-VEGF (1:200, sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-TNFα (1:500, sc-52746, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-IL-10 (1:6000, sc-365858, Santa Cruz

Biotechnology, CA, USA).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98 °C utilizando solução de ácido cítrico (0,54 mol/L; pH 6,0). As lâminas foram incubadas por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA), seguida da incubação com os anticorpos primários em câmara úmida *overnight*. A incubação com o anticorpo secundário ocorreu por 45 minutos, com posterior incubação na estreptavidina peroxidase por 30 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA. USA). Por último, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução tamponada de fosfato (PBS)(SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

Foram realizadas avaliações descritivas e quantitativas da imunomarcagem de HIF1 α , 8-OHdG, SOD1, catalase, GPx1/2, GRP78, CHOP, VEGF, IL-10 e TNF α na decidua, ZJ e LP. A avaliação quantitativa foi realizada aleatoriamente em seis discos placentários/grupo e utilizando imagens de cinco campos aleatórios de cada região avaliada. Para isso, imagens foram obtidas com um Microscópio fotônico Leica DMI 300B (Leica Microsystems, Germany) no aumento de 400x. Para essa avaliação foi utilizado o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados de cada região avaliada foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcagem em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

7.4.6 PCR em tempo real (qPCR)

Para a realização da técnica de qPCR, primeiramente foi extraído o mRNA dos discos placentários utilizando Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme o protocolo do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada com 1 μ g de RNA, utilizando o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Os transcritos gênicos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando PowerUp™ SYBR™ Green (Master Mix Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green, Thermo Fisher scientific) no equipamento Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies). Para as reações de qPCR utilizou-se 1 μ L de cDNA, 100nM de cada iniciador e 7,5 μ L do reagente PowerUP em um volume final de 15 μ L de reação. No 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 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Foi realizado um teste de eficiência da amplificação da qPCR utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de *melting* dos produtos da amplificação. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA de *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de RNA *polymerase II subunit A (Polr2a)* de *Rattus norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SOLANO *et al.*, 2016).

Tabela 1: Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qPCR.

Genes	Iniciadores	Nº acesso
<i>Hif1a</i>	Forward: AGCAATTCTCCAAGCCCTCC Reverse: TTCATCAGTGGTGGCAGTTG	NM_024359.1
<i>Nrf2</i>	Forward: CCCATTGAGGGCTGTGATCT Reverse: GCCTTCAGTGTGCTTCTGGTT	NM_031789.2
<i>Sod1</i>	Forward: GAAAGGACGGTGTGGCCAAT Reverse: CTCGTGGACCACCATAGTACG	NM_017050.1
<i>Gpx1</i>	Forward: GCGCTACAGCGGATTTTGA Reverse: GAAGGCATACACGGTGGACT	NM_030826.3
<i>Cat</i>	Forward: CTGACTGACGCGATTGCCTA Reverse: GTGGTCAGGACATCGGGTTT	NM_012520.2
<i>Atf6</i>	Forward: CCAGCAGAAAACCCGCATTC Reverse: CAGAATTCCTGATGCTAGTGGTT	XM_017598829.1
<i>Perk</i>	Forward: GGCTGGTGAGGGATGGTAAA Reverse: TTGGCTGTGTAACCTGTGTCATCA	NM_031599.2
<i>Grp78</i>	Forward: TGAAGGGGAGCGTCTGATTG Reverse: TCATTCCAAGTGCGTCCGAT	NM_013083.2
<i>Chop</i>	Forward: TGGCACAGCTTGCTGAAGAG Reverse: TCAGGCGCTCGATTTCTT	NM_001109986.1
<i>Polr2a</i>	Forward: GCTGGACCTACTGGCATGTT Reverse: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	NM_001079162.5

7.4.7 Avaliação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutational transferase (GST) e catalase

As amostras de placentas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (TFK) 50 nmol (pH7,0) e centrifugadas a 13.400 rpm a 4°C por 10 minutos para a coleta dos sobrenadantes. A concentração das proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (1976),

enquanto as atividades enzimáticas de SOD, GST e catalase foram avaliadas de acordo com Habig *et al.*, (1974), Marklund and Marklund (1974) e Aebi (1984), respectivamente.

7.4.8 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para comparação entre dois grupos utilizou-se o teste t de *Student* não pareado e para mais de dois grupos realizou-se análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste Student Newman Keuls (SNK). As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 8.0.2 ® e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

7.5 RESULTADOS

7.5.1 A administração de MnPs não compromete o desenvolvimento feto-placentário de ratas gestantes e aumenta o peso fetal.

Primeiramente, verificamos se a administração das MnPs I e II poderia comprometer o desenvolvimento feto-placentário na rata, uma vez que até o momento não tinham sido utilizadas durante a gestação em modelos animais experimentais. Foi observado que as MnPs na dose de 0,1mg/Kg/dia a partir do 8º DG não afetou o número de fetos e não comprometeu o peso fetal aos 18 DG, sendo que o peso fetal do grupo que recebeu a MnP I foi até maior quando comparado ao grupo controle (Figura 2C-D; $P < 0,05$). Além disso, a administração das MnPs não afetou o peso da unidade útero-placentária e do líquido amniótico (Figura 2A-B).

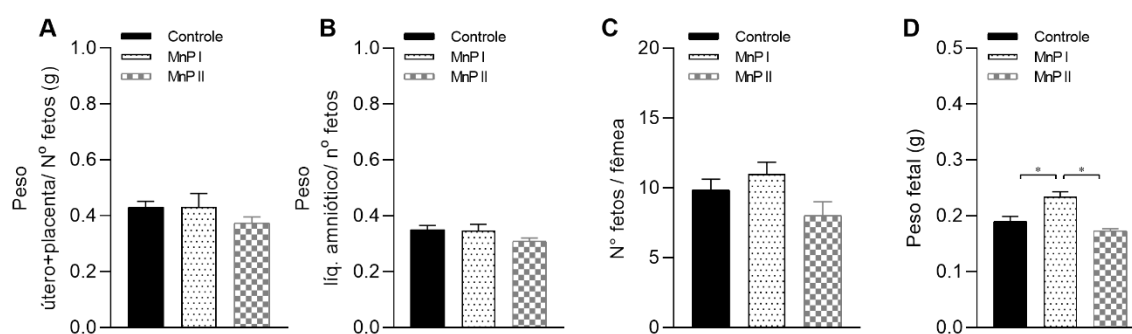


Figura 2- Parâmetros reprodutivos de ratas tratadas com MnPI e MnPII durante a gestação. A) Peso útero-placentário/ n°fetos (g); B) Peso do líquido amniótico/n° fetos C) Número de fetos / fêmea e D) Peso dos fetos (g)(média $\pm$ SEM; * $p < 0,05$; Teste SNK; N= 3-7/grupo (A-C); N= 22/grupo (D)).

7.5.2 O tratamento com MnPs melhora o peso fetal e a morfologia placentária em ratas hipotireoideas

Considerando que no primeiro experimento a administração das MnPs não

comprometeu os parâmetros reprodutivos de ratas, avaliou-se no segundo experimento o potencial terapêutico dessas MnPs na restrição feto-placentária apresentada por ratas com hipotireoidismo (SILVA *et al.*, 2012). Na avaliação dos parâmetros maternos e placentários, foi observado que os tratamentos com as MnPs I e II não foram capazes de aumentar a concentração plasmática do T₄ livre, o menor peso útero-placentário e do líquido amniótico apresentado pelas ratas hipotireoideas quando comparadas ao grupo controle (Figura 3A,B,C). Além disso, não houve diferença significativa no número de fetos em relação ao grupo hipotireoideo, que estavam reduzidos em relação ao controle (Figura 3D; $P < 0,05$). No entanto, o tratamento com as MnPs foi capaz de aumentar o baixo peso fetal apresentado pelas ratas hipotireoideas (Figura 3E; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Interessantemente, o tratamento com a MnPI também aumentou os pesos dos órgãos fetais (fígado, rins, coração, pulmões) das ratas hipotireoideas, que estavam reduzidos em relação ao controle (Figura 3F-I).

Uma vez que o tratamento com as MnPs aumentou o peso fetal das ratas hipotireoideas, verificamos se esse efeito estaria associado a uma alteração da morfologia placentária, uma vez que não houve diferença no peso da unidade útero-placenta. O tratamento com as MnPs restaurou parcialmente a espessura do LP das ratas hipotireoideas, uma vez que o hipotireoidismo reduziu a espessura dessa camada em relação ao controle e os tratamentos com as MnPs não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 4E). Além disso, os tratamentos com as MnPs I e II restauraram a celularidade da ZJ, uma vez que o hipotireoidismo aumentou a proporção de células de glicogênio nessa camada da placenta ($P < 0,01$), enquanto os tratamentos com as MnPs reduziram essa população se igualando ao controle (Figura 4F; $P > 0,05$). No LP, o tratamento com ambas as MnPs não somente aumentou a área ocupada por seio vascular materno comparado aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 4G; $P < 0,05$; $P < 0,01$), como também a área ocupada por capilar fetal (Figura 4G; $P < 0,001$; $P < 0,0001$), que estava reduzida no grupo hipotireoideo em relação ao controle ($P < 0,05$). Em relação à área ocupada por mesênquima fetal/trofoblasto, houve uma redução nos grupos tratados com MnPs em relação ao controle e hipotireoideo (Figura 4G; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$).

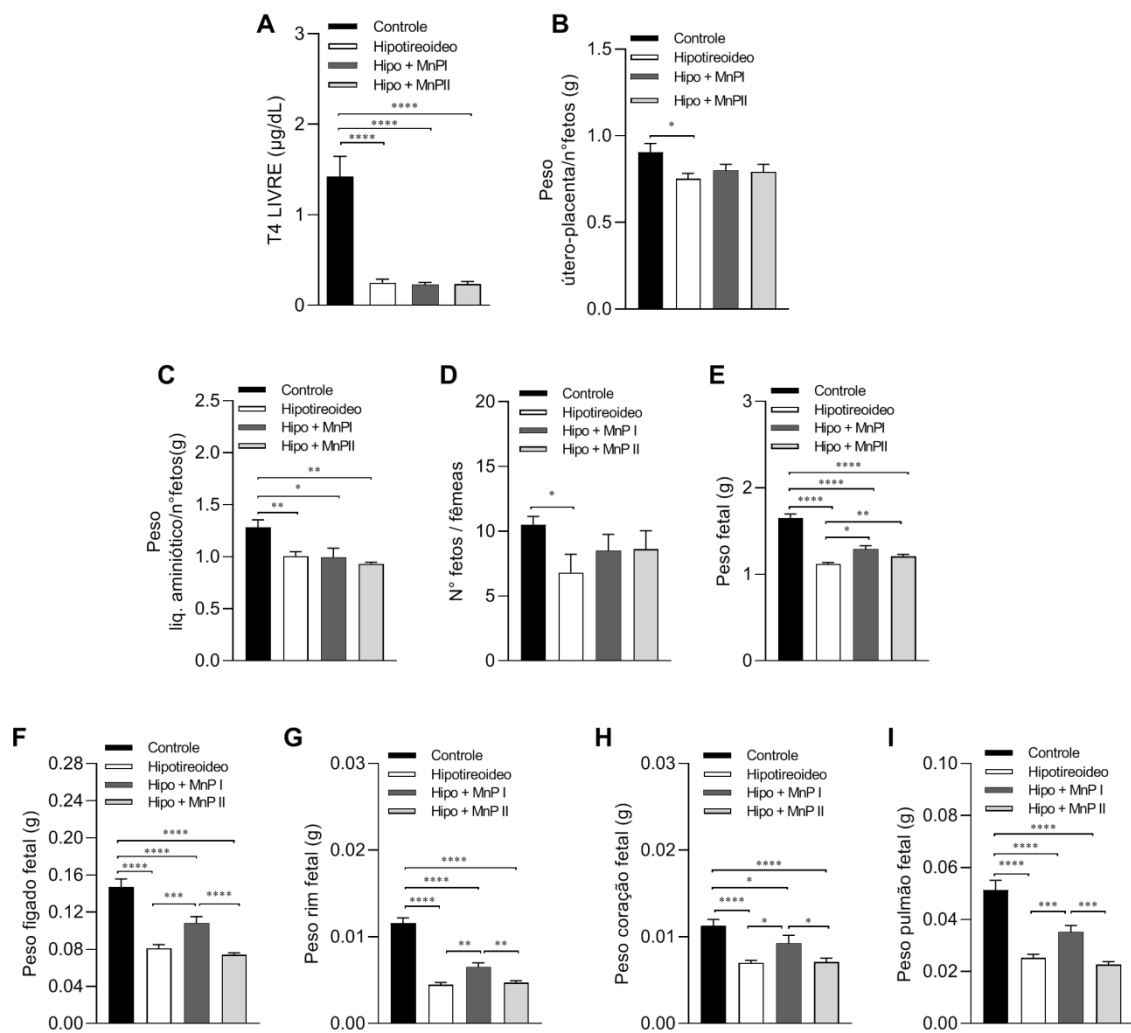


Figura 3- Dosagem plasmática de T4 livres no dia 0 de gestação e parâmetros reprodutivos das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Dosagem plasmática T4 livres no dia 0 de gestação; B) Peso uteroplacentário/nº fetos; C) Peso do líquido amniótico/ nº fetos (g); D) Número de fetos/ fêmea; E) Peso fetal (g); F-I) Peso do fígado (F), rim (G), coração (H) e pulmão (I) fetal (g) (média±SEM; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001; Teste SNK; N=5-6/grupo (A-C); N= 22/grupo (D); N= 19-31/grupo (F-I)).

7.5.3 O tratamento com MnPs reduz a expressão de HIF1α na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas

Pelo fato do tratamento com as MnPs ter melhorado a morfologia placentária e o desenvolvimento fetal das ratas hipotireoideas e de estudos recentes do nosso grupo terem demonstrado que há hipóxia na interface materno-fetal de ratas com hipotireoidismo (SANTOS *et al.*, 2021a), avaliamos a expressão de HIF1α, um marcador de hipóxia (SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017), e de *Nrf2*, um fator de transcrição envolvido na

expressão de enzimas antioxidantes (FRANCISQUETI-FERRON *et al.*, 2019b). A imunomarcagem de HIF1 α na interface materno-fetal dos animais demonstrou que os tratamentos com as MnPs I e II foram capazes de reduzir a expressão proteica de HIF1 α na decídua e ZJ das ratas hipotireoideas (Figura 5B; $P < 0,05$; $P < 0,01$), se igualando à expressão das ratas controles ($P > 0,05$). O mesmo foi observado em relação a expressão gênica, na qual o tratamento com a MnP I reduziu a expressão de mRNA para *Hif1 α* na placenta das ratas hipotireoideas (Figura 5C; $P < 0,05$), se igualando ao controle ($P > 0,05$). Em relação à expressão de transcritos para *Nrf2*, embora o hipotireoidismo tenha aumentado a sua expressão placentária em relação ao controle ($P < 0,05$), o tratamento com as MnPs não apresentou diferença significativa em relação aos grupos hipotireoideo e controle (Figura 5C; $P > 0,05$).

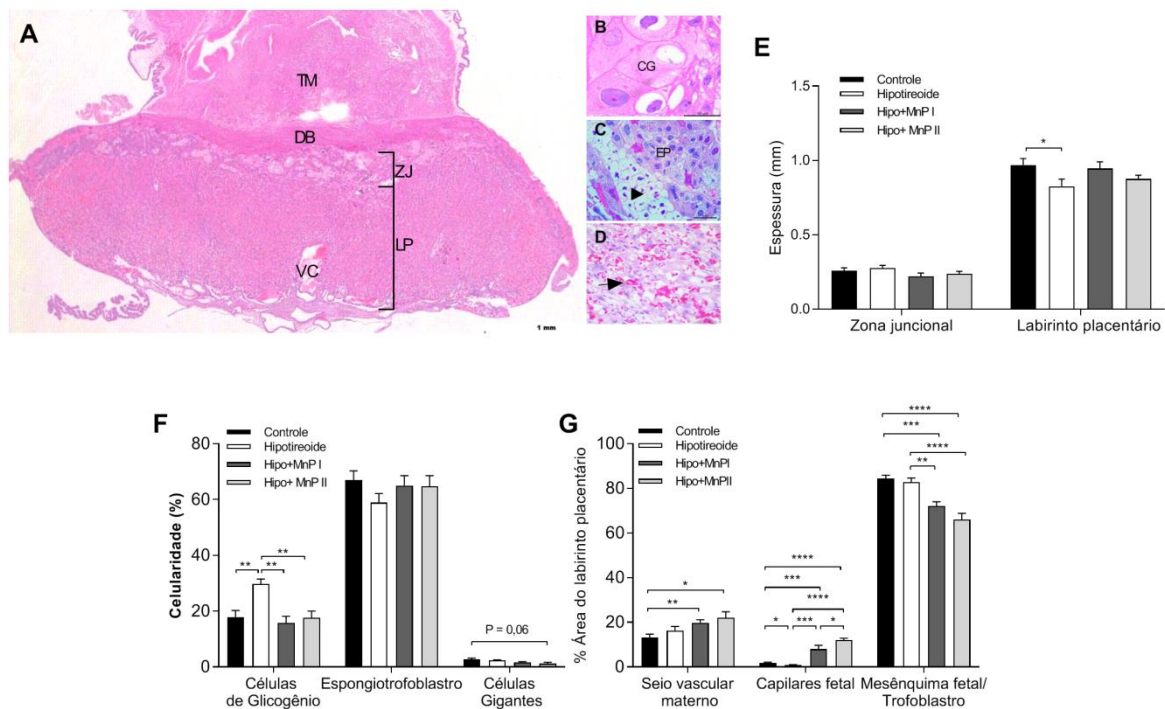


Figura 4- Análise histomorfométrica da placenta das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Fotomicrografia da interface materno-fetal evidenciando a decídua e placenta aos 18 DG; B-D) Fotomicrografias das camadas da placenta evidenciando a camada de células gigantes (B) e o espongiotrofoblasto (C) da ZJ e o LP (D) (Coloração de Hematoxilina e eosina; Barra= 500 μ m (A); 50 μ m (B-D)). E) Espessura da ZJ (células gigantes+espongiotrofoblasto) e LP; F) Porcentagem de área ocupada por células de glicogênio, espongiotrofoblastos e células gigantes na zona juncional (média $\pm$ SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Teste SNK; N= 8/grupo); G) Porcentagem de área ocupada por seio vascular materno, capilar fetal e mesênquima fetal/trofoblasto do LP (média $\pm$ SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Teste SNK; N= 10/grupo). TM= Triângulo metrial; DB= Decídua Basal; ZJ= Zona Juncional; LP= Labirinto Placentário; VC= Vaso central; CG= células gigantes trofoblásticas; EP= espongiotrofoblastos; Seta= seio vascular materno, Cabeça de seta= Células de glicogênio.

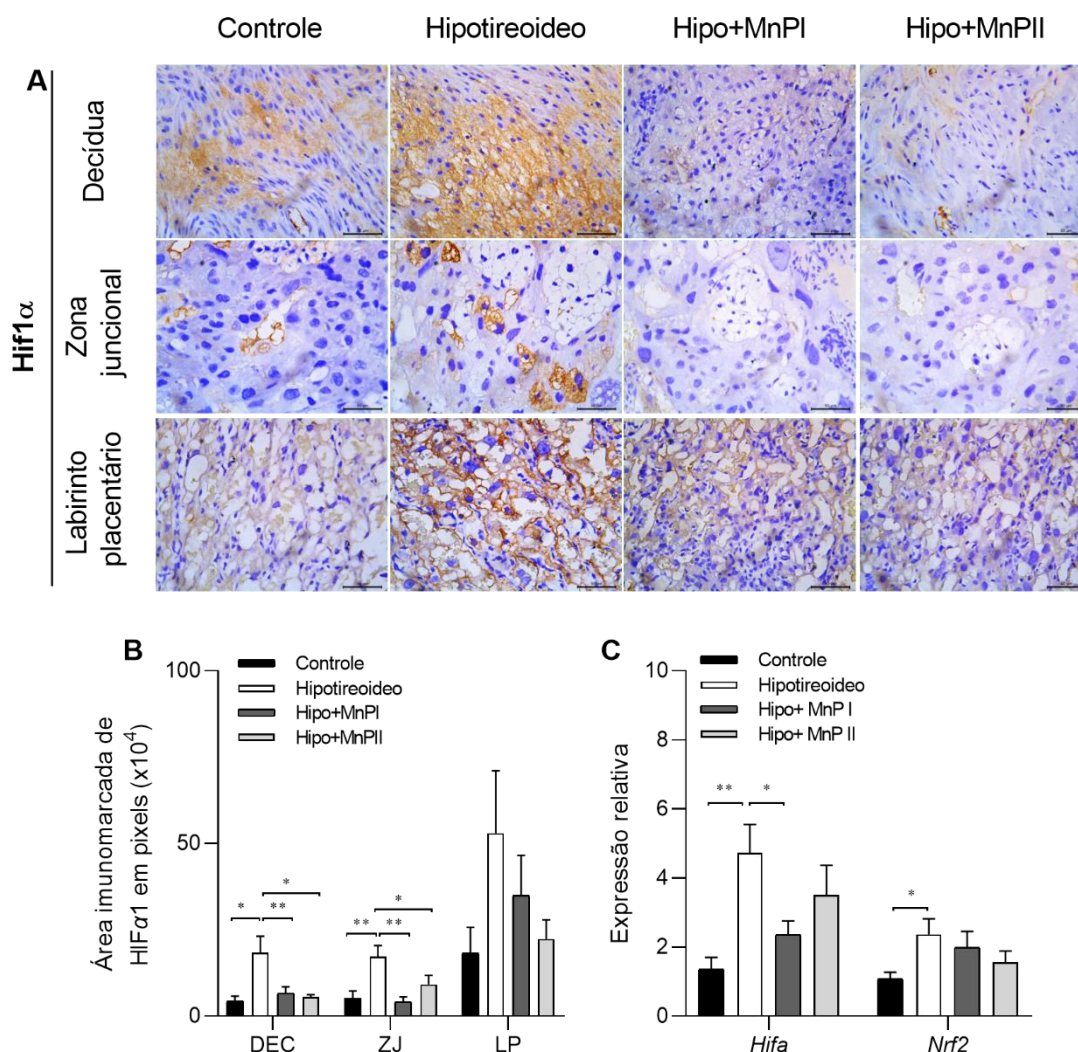


Figura 5-Expressão de HIF1 α e Nrf2 na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A) Fotomicrografias da imunomarcagem de HIF1 α na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B) Área de imunomarcagem em pixels do HIF1 α na decídua, zona juncional e labirinto placentário; C) Expressão gênica relativa do *Hif1 α* e *Nrf2* na placenta (média $\pm$ SEM, * p <0,05; ** p <0,01; Teste SNK; N= 6-8/grupo) DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.

7.5.4 O tratamento com MnPs bloqueia o aumento decidual de 8-OHdG nas ratas hipotireoideas

Uma vez que o tratamento com as MnPs reduziu a expressão de HIF1 α na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas, avaliamos a imunomarcagem de 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), um biomarcador de dano oxidativo ao DNA (URBANIÁK *et al.*, 2020), uma vez que estudos prévios demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas (SANTOS *et al.*, 2021a; SILVA; OCARINO;

SERAKIDES, 2014). Interessantemente, os tratamentos com as MnPs I e II bloquearam a maior expressão decidual de 8-OHdG observada no grupo hipotireoideo (Figura 6A-B; $P<0,001$), igualando a expressão desse biomarcador à do grupo controle ($P>0,05$).

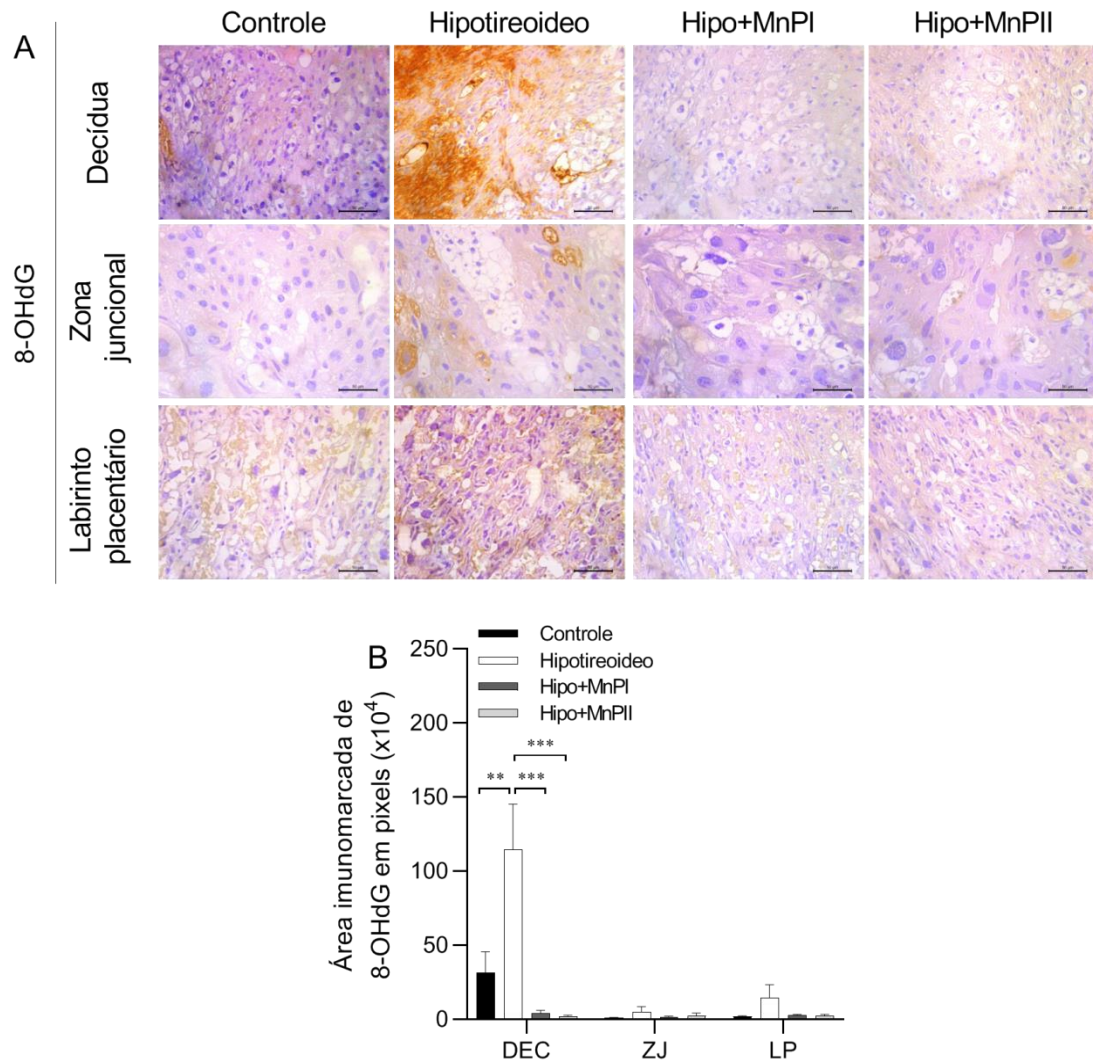


Figura 6-Expressão de 8-OHdG na decidua e placenta de ratos controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação A) Fotomicrografias da imunomarcagem de 8-OHdG na decidua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B) Área de imunomarcagem em pixels do 8-OHdG na decidua, zona juncional e labirinto placentário (média $\pm$ SEM, ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; Teste t de Student; N= 6-7/grupo). DEC= decidua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.

7.5.5 O tratamento com MnPs aumenta a expressão proteica de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas e restaura a expressão gênica placentária de *Gpx1*

Considerando que houve aumento da expressão de HIF1 α , 8-OHdG e *Nrf2* na interface materno-fetal do grupo hipotireoideo e que o tratamento com as MnPs reduziu a expressão de HIF1 α e 8-OHdG, avaliou-se a expressão e/ou atividade enzimática de SOD1, Catalase, GPx1 e GST, as principais enzimas antioxidantes envolvidas no controle de estresse oxidativo em condições de hipóxia (MISTRY; WILLIAMS, 2011; SHENG et al., 2014a). A análise imuno-histoquímica demonstrou que os tratamentos com as MnPs I e II aumentaram a imunomarcagem de SOD1 na ZJ e LP em relação aos grupos controle e hipotireoideo e na decídua em comparação às ratas controle (Figura 7AB; P< 0,05; P< 0,01), enquanto a MnP I reduziu a expressão placentária de transcritos para *Sod1* em relação ao grupo hipotireoideo (Figura 7G; P< 0,05).

A imunomarcagem de GPx1/2, de forma semelhante ao ocorrido para SOD1, também foi aumentada na ZJ pelos tratamentos com as MnPs em relação aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 7C-D; P< 0,01). Em relação à expressão gênica, ambos os tratamentos também restauraram a expressão de mRNA de *Gpx1*, reduzindo seus níveis em relação ao grupo hipotireoideo e se igualando ao controle (Figura 7G; P< 0,01).

Em relação à imunomarcagem de catalase, foi observado aumento da sua expressão na decídua, ZJ e LP nas ratas hipotireoideas tratadas com a MnPII em relação aos outros grupos (Figura 7E-F, P< 0,05; P< 0,01), enquanto os tratamentos com as MnPs I e II não alteraram a maior expressão gênica de *Cat* apresentada pelas ratas hipotireoideas em relação ao controle (Figura 7G).

Quanto à atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta, os tratamentos com as MnPs não alteraram a menor atividade causada pelo hipotireoidismo em relação ao controle (Figura 7H).

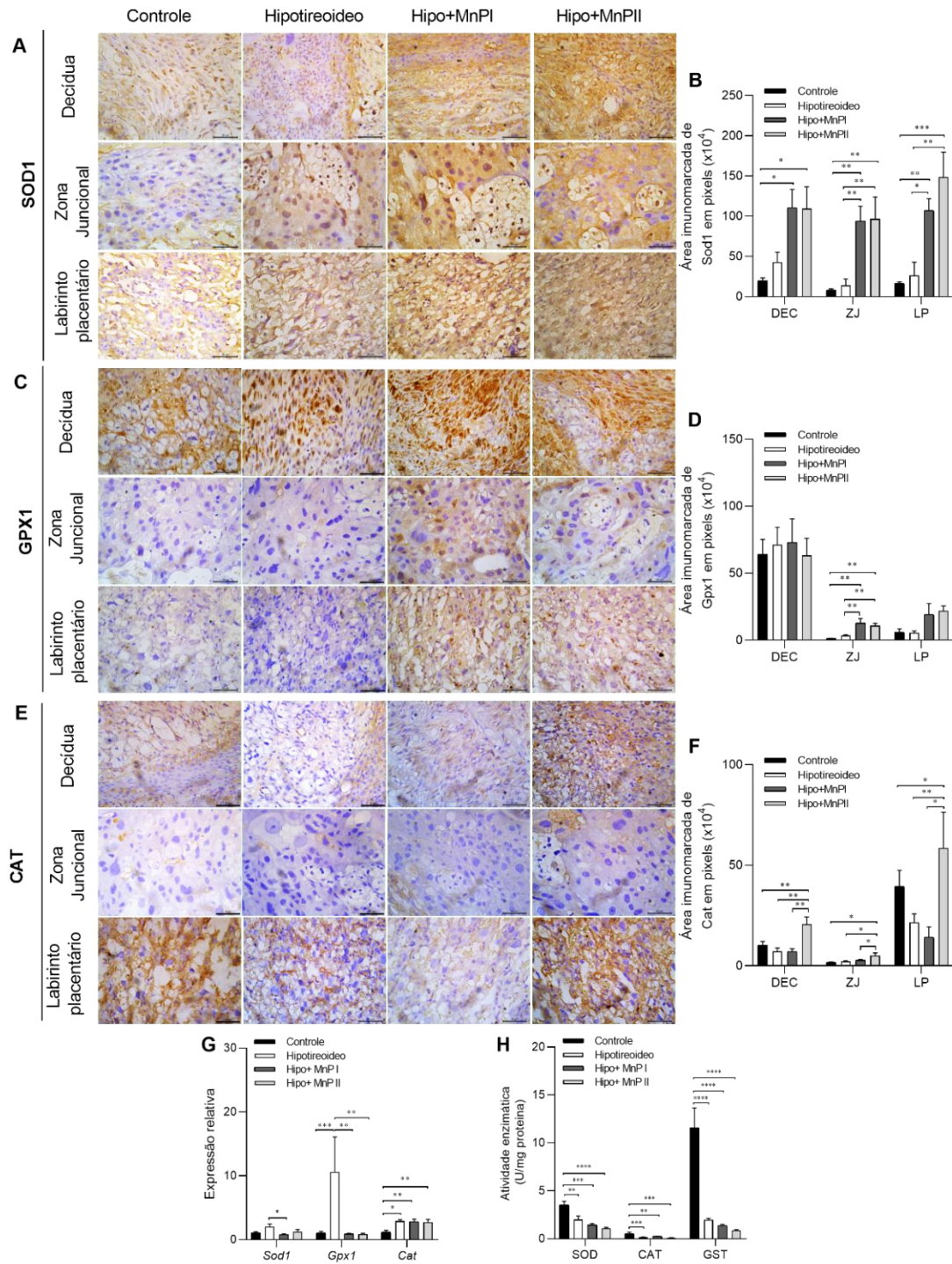


Figura 7-Expressão e atividade de enzimas antioxidantes na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcagem de SOD1 (A), GPx1 (C) e catalase (E) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B,D,F) Área de imunomarcagem em pixels de SOD1 (B), GPx1 (D) e catalase (F) na decídua, zona juncional e labirinto placentário. G) Expressão gênica relativa de *Sod1*, *Gpx1* e *Cat* na placenta. H) Atividade enzimática de SOD, catalase e GST na placenta (média $\pm$ SEM, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.

7.5.6 O tratamento com MnPs bloqueia o aumento de mediadores de estresse reticular na interface materno-fetal causado pelo hipotireoidismo

Pelo fato de estudos recentes terem comprovado que o hipotireoidismo causa estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal de ratas (SANTOS *et al.*, 2021a), verificamos se o tratamento com as MnPs I e II também poderia impedir a ocorrência desse processo. Para isso, foi realizada a análise da expressão de GRP78 e CHOP, que são mediadores-chaves da via de ativação da resposta a proteínas mal-enoveladas (*unfolded protein response*; UPR) e que indicam a ocorrência de estresse reticular (RODRIGUEZ *et al.*, 2011; RON; HARDING, 2012; WANG; KAUFMAN, 2016). Os tratamentos com as MnPs I e II reverteram a maior expressão decidual de GRP78 causada pelo hipotireoidismo (Figura 8A-B; $P < 0,01$), igualando a expressão à do grupo controle ($P > 0,05$), enquanto não foram observadas diferenças na expressão gênica placentária entre grupos (Figura 8E).

Em relação à imunomarcação de CHOP, a MnPI reduziu a maior expressão decidual causada pelo hipotireoidismo, enquanto ambas as MnPs não alteraram a maior expressão na ZJ observada nas ratas hipotireoideas em relação ao controle (Figura 8C-D). Curiosamente, os tratamentos com as MnPs I e II aumentaram a expressão de CHOP no LP das ratas hipotireoideas (Figura 8D; $P < 0,05$; $P < 0,01$). Em contrapartida, ambas as porfirinas reduziram a maior expressão gênica placentária de *Chop* causada pelo hipotireoidismo (Figura 8E), se igualando ao grupo controle ($P > 0,05$).

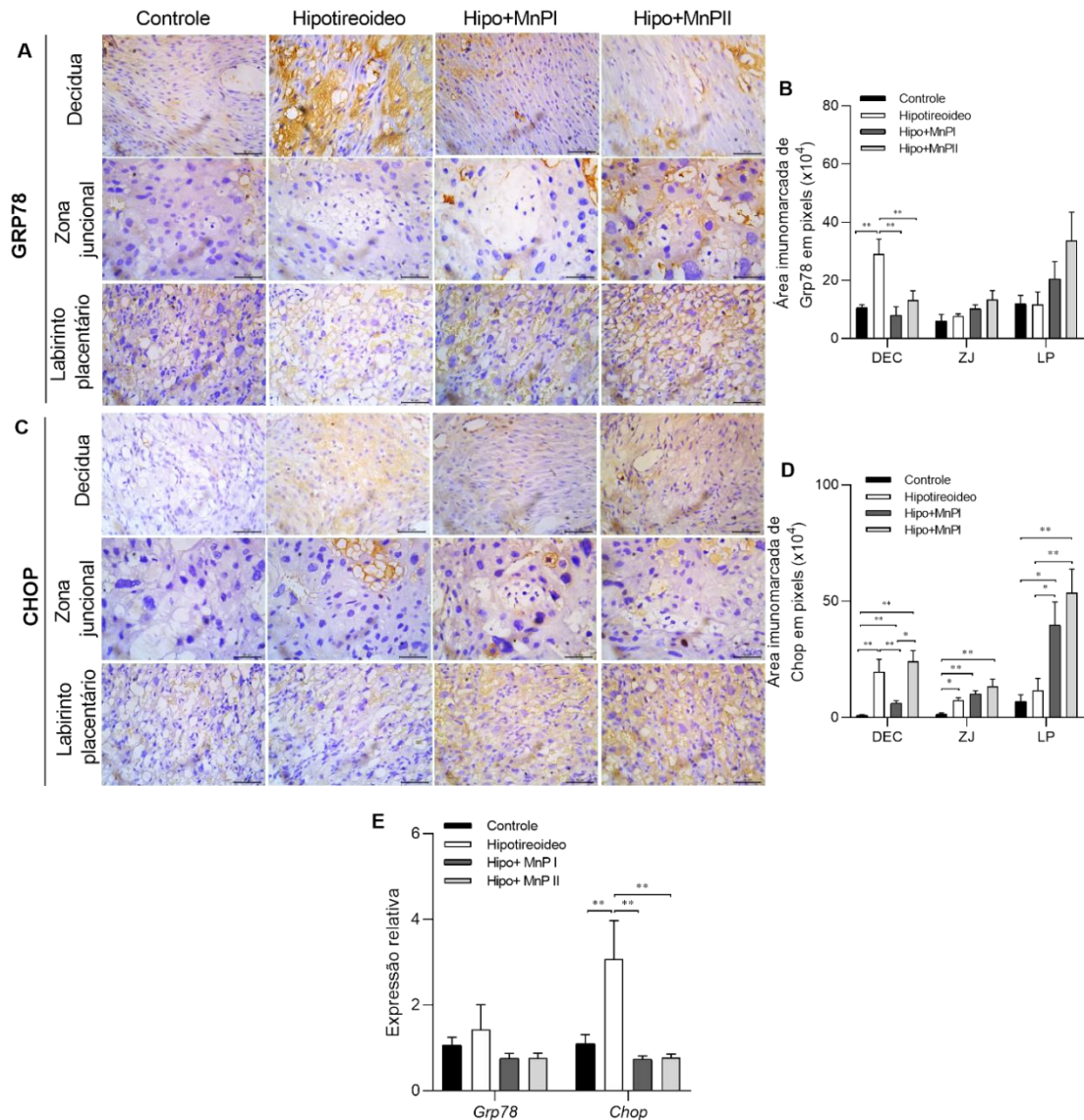


Figura 8-Expressão de GRP78 e CHOP na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A-C) Fotomicrografias da imunomarcaçãode GRP78 (A) e CHOP (C) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B-D) Área de imunomarcação em pixels de GRP78 (B) e CHOP (D) na decídua, zona juncional e labirinto placentário; E) Expressão gênica relativa de *Grp78* e *Chop* na placenta (média $\pm$ SEM, * p < 0,05; ** p < 0,01; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.

7.5.7 O tratamento com MnPs restaura a expressão decidual e/ou placentária de VEGF e IL-10 na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas

Uma vez que as MnPs aumentaram a expressão de enzimas antioxidantes e bloquearam o aumento de HIF1 α , 8-OHdG e de mediadores de estresse reticular na interface

materno-fetal das ratas hipotireoideas, avaliou-se a expressão proteica de VEGF, TNF α e IL-10 na interface materno-fetal desses animais, uma vez que esses são importantes mediadores angiogênicos e imunológicos para a função placentária adequada (SILVA; SERAKIDES, 2016). O tratamento com a MnPI reduziu a maior imunomarcção de VEGF na ZJ causada pelo hipotireoidismo (Figura 9A-B; $P < 0,05$), igualando ao grupo controle ($P > 0,05$), enquanto não foram observadas diferenças quando as ratas foram tratadas com a MnPII. No LP e na decídua, a maior expressão de VEGF causada pelo hipotireoidismo não foi alterada pelos tratamentos com as MnPs (Figura 9B; $P > 0,05$).

Em relação ao TNF α , as MnPs I e II aumentaram sua expressão no LP e decídua, respectivamente, em relação aos grupos controle e hipotireoideo (Figura 9C-D; $P < 0,01$; $P < 0,001$; $P < 0,0001$), enquanto na ZJ as MnPs não alteraram a maior expressão de TNF α causada pelo hipotireoidismo (Figura 9D). Já em relação à IL-10, interessantemente, ambas as porfirinas reduziram a maior expressão decidual causada pelo hipotireoidismo, se igualando ao grupo controle (Figura 9E-F). No LP, o tratamento com a MnPI também reduziu a imunomarcção de IL-10 nas ratas hipotireoideas ($P < 0,01$), se igualando ao controle, enquanto na ZJ não houve diferença significativa na imunomarcção entre os grupos (Figura 9F).

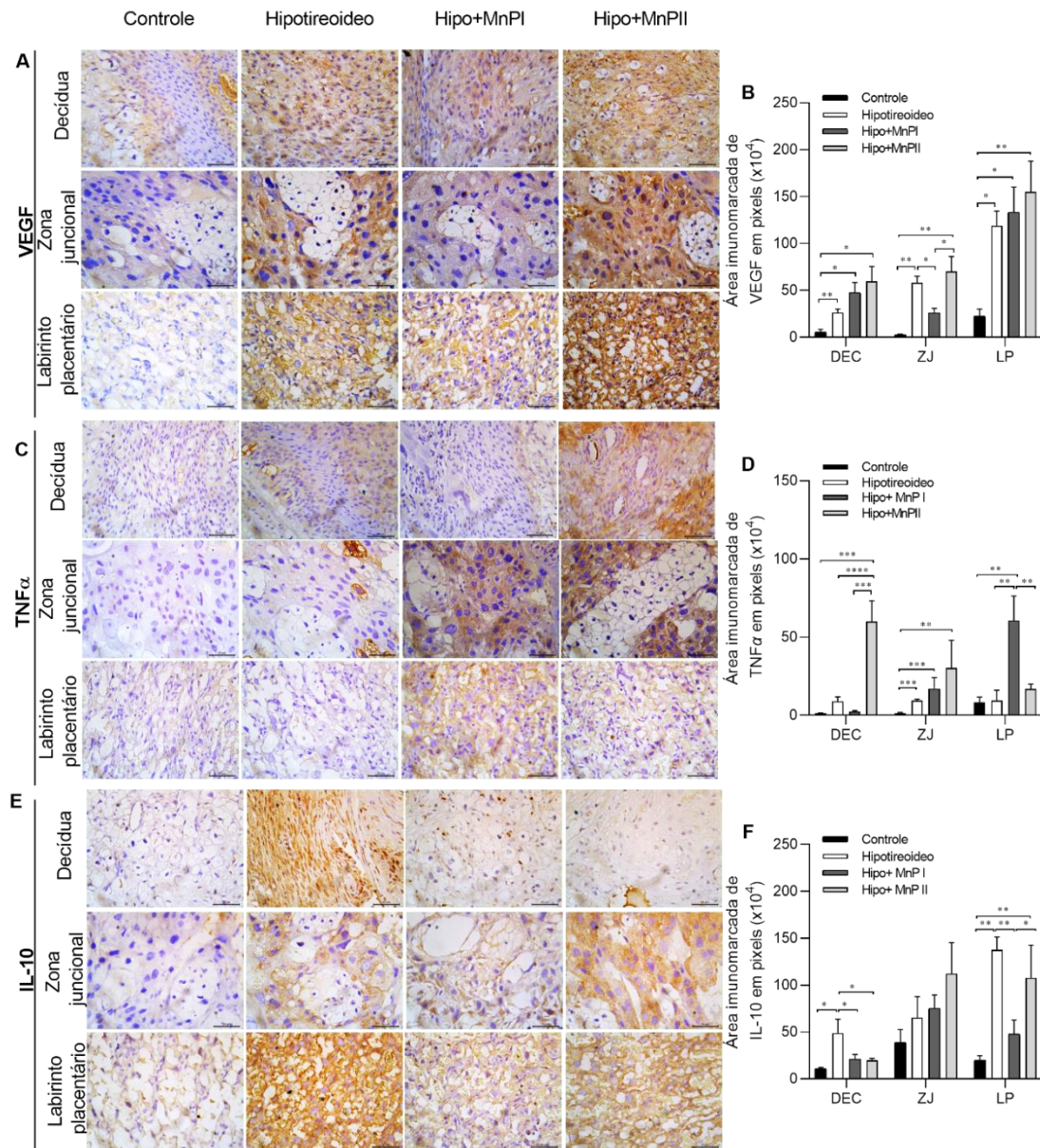


Figura 9-Expressão de VEGF, TNF α e IL10 na interface materno-fetal das ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com MnPI e MnPII aos 18 dias de gestação. A,C,E) Fotomicrografias da imunomarcção de VEGF (A), TNF α (C) e IL10 (E) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracorado com Hematoxilina de Harris, Barra= 50 μ m). B,D,F) Área de imunomarcção em pixels de VEGF (B), TNF α (D) e IL10 (F) na decídua, zona juncional e labirinto placentário (média $\pm$ SEM, * p < 0,05; ** p < 0,01; * p < 0,001; **** p < 0,0001; Teste SNK; N= 6-8/grupo). DEC= decídua; ZJ= zona juncional; LP= labirinto placentário.**

7.6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração das metaloporfirinas de manganês MnIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIT5B3EPyP (MnP II) não somente melhorou o desenvolvimento fetal, a morfologia e a vascularização placentárias de ratas com hipotireoidismo materno, como protegeu contra a hipóxia, o estresse oxidativo e o estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal desses animais, além de restaurar a expressão placentária e/ou decidual de IL-10 e VEGF. Este é o primeiro estudo a avaliar o potencial terapêutico de MnPs em uma doença gestacional associada a estresse placentário, além de ser o primeiro a avaliar a MnIIIT5B3EPyP em um modelo experimental.

Como as MnPs I e II não haviam sido utilizadas em um modelo gestacional, procuramos inicialmente verificar a segurança de sua administração durante a gestação em ratas. Ambas as MnPs I e II não comprometeram o número de fetos e o peso fetal, bem como o peso da unidade útero-placentária e do líquido amniótico, sendo que o peso fetal observado nas ratas tratadas com a MnP I foi ainda maior em relação às ratas que não receberam MnP. Esses dados sugerem que o uso de MnPs na dose de 0,1mg/Kg/dia e a partir do 8º dia de gestação é seguro para o desenvolvimento fetal e placentário no modelo animal utilizado. Dessa forma, ao administrar as MnPs I e II em ratas com hipotireoidismo materno, demonstramos que o uso de ambas não somente aumentou o peso fetal das ratas hipotireoideas, como a MnP I aumentou o peso dos órgãos fetais. O aumento do peso fetal, bem como de órgãos fetais como fígado, rins, coração e pulmões, são importantes para o desenvolvimento adequado do feto, uma vez que o desenvolvimento intrauterino e o tamanho ao nascimento são fatores determinantes da saúde pós-natal (SHARMA; SHASTRI; SHARMA, 2016). Além disso, a RCIU favorece a ocorrência de distúrbios pós-natais como doenças cardiovasculares, renais e metabólicas (ARMENGAUD *et al.*, 2021; VARVARIGOU, 2010).

A melhora no desenvolvimento fetal das ratas hipotireoideas causada pelas MnPs também foi associada a uma melhora na morfologia e vascularização placentária, uma vez que as MnPs não somente restabeleceram a população de células de glicogênio na zona juncional das ratas hipotireoideas, como também aumentaram a área ocupada por seio vascular materno e capilar fetal no labirinto placentário. O aumento das células de glicogênio na placenta das ratas hipotireoideas do presente estudo também já foi descrito por Silva *et al.* (2012) e a normalização dessa população celular causada pelo tratamento com as MnPs sugere o restabelecimento da diferenciação adequada das células trofoblásticas durante a formação e desenvolvimento da placenta e/ou sua migração adequada em direção à decídua, uma vez que

estudos sugerem a participação das células de glicogênio no processo de invasão e remodelamento das artérias espirais uterinas (AIN; CANHAM; SOARES, 2003; WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018). Além disso, estudos têm sugerido que alterações nas populações de células de glicogênio estão na gênese de doenças gestacionais em modelos experimentais, principalmente quando há crescimento fetal alterado (AKISON *et al.*, 2017). Por isso, a melhora nessa população celular após o tratamento com as MnPs pode ter contribuído para o aumento do peso fetal observado. A maior vascularização na placenta das ratas hipotireoideas causada pelas MnPs também favorece o maior peso fetal, pois permite maior aporte de oxigênio e nutrientes para o feto em desenvolvimento. Corroborando com os nossos resultados, Zhou *et al.*, (2015) demonstraram *in vitro* um aumento da angiogênese em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) quando tratadas com outra formulação de MnP (MnTBAP), sugerindo um efeito pró-angiogênico das MnPs.

Além da melhora na morfologia e vascularização placentária, as MnPs foram capazes de reduzir a expressão de HIF1 α e 8-OHdG na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas, biomarcadores de hipóxia celular e dano oxidativo ao DNA, respectivamente (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017; URBANIAK *et al.*, 2020). Estudo recente tinha demonstrado a ocorrência de hipóxia e estresse oxidativo na placenta e decídua de ratas hipotireoideas (SANTOS *et al.*, 2021a), enquanto um estudo prévio utilizando a MnP I também demonstrou redução da expressão proteica de 8-OHdG e HIF1 α em carcinomas mamários ortotópicos 4T1 em camundongos Balb/c, sugerindo redução da hipóxia e estresse oxidativo nesse modelo experimental (RABBANI *et al.*, 2009). Já Gauter-Fleckenstein *et al.* (2010) também demonstraram redução da imunomarcação de HIF1 α e 8-OHdG em modelo de lesão pulmonar induzida por radiação em ratas usando a mesma porfirina. Em conjunto, nossos resultados sugerem que as MnPs I e II possuem efeitos protetores contra a hipóxia e o estresse oxidativo placentário causados pelo hipotireoidismo materno e que a MnP II, que até o momento não tinha sido avaliada *in vitro* e *in vivo*, apresenta efeitos citoprotetores semelhantes à MnP I contra o estresse oxidativo.

A redução da hipóxia e do dano oxidativo na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas do presente estudo pode ser resultado não somente do aumento da vascularização placentária causado pelas MnPs I e II, permitindo maior aporte de oxigênio para a interface materno-fetal, mas também da ação direta dessas MnPs que apresentam ação mimética à SOD e potente ação catalítica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, principalmente superóxido e peroxinitrito (RABBANI *et al.*, 2009). Nesse sentido, embora os tratamentos com as MnPs I e II não tenham sido capazes de aumentar a expressão gênica

placentária de *Nrf2* nas ratas com hipotireoidismo, um fator de transcrição envolvido na expressão de enzimas antioxidantes (BATINIC-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2018), ambas as porfirinas foram capazes de aumentar de forma semelhante a expressão proteica placentária e/ou decidual de SOD1 e GPx1/2 nas ratas hipotireoideas, importantes enzimas antioxidantes envolvidas no controle de espécies reativas de oxigênio nos sistemas biológicos (DEY; SIDOR; O'ROURKE, 2016; WATANABE *et al.*, 2014). De forma interessante, a MnP II, diferentemente da MnP I, também foi capaz de aumentar a expressão proteica decidual e placentária de catalase, demonstrando que na interface materno-fetal de ratas a MnP II apresenta maior potencial no aumento de enzimas antioxidantes em relação à MnP I. Além disso, ambas as porfirinas foram capazes de restaurar a expressão gênica placentária de *Gpx1*, se igualando ao controle, além de reduzir a maior expressão gênica de *Sod1* causada pelo hipotireoidismo, demonstrando o potencial dessas MnPs na regulação do estado redox celular.

Diferentemente dos nossos resultados, estudos recentes com a MnP I demonstraram aumento da expressão de NRF2 em modelo *in vitro* utilizando fibroblastos de próstata de camundongo e humano irradiados (SHRISHRIMAL *et al.*, 2020), como também em fibroblastos de próstata humana irradiados e em condições hiperglicêmicas (CHATTERJEE *et al.*, 2020). Sabe-se que a ativação da via NRF2 por miméticos da SOD a base de porfirina é essencial na regulação de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPX e MnSOD (BATINIC-HABERLE; TOVMASYAN; SPASOJEVIC, 2018). Vale ressaltar que o presente estudo analisou somente a expressão gênica placentária de *Nrf2*, sendo que a análise da imunomarcação, como feito para as enzimas antioxidantes, permitiria uma análise mais completa da expressão desse fator. Além disso, os estudos realizados por Shrishrimal *et al.*, (2020) e Chatterjee *et al.*, (2020) foram *in vitro*, que não representam na totalidade a complexidade de estudos *in vivo* como o presente trabalho.

Em contrapartida, nossos resultados referentes à imunomarcação e expressão gênica das enzimas antioxidantes estão de acordo com Cheng *et al.* (2015), que demonstraram que o pré-tratamento com a MnTM-4-PyP em um modelo *in vitro* de estresse oxidativo utilizando neurônios corticais de rato expostos a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) aumentou significativamente os níveis proteicos de SOD1, SOD2 e CAT, enquanto reduziu a expressão gênica de *Sod1* e *Cat*. A diferença em relação aos níveis de proteína e mRNA apresentada nesse estudo e no presente trabalho ocorrem, possivelmente, devido à meia-vida curta do mRNA ou feedback negativo da transcrição (HARDIN; HALL; ROSBASH, 1992; VOGEL; MARCOTTE, 2012). Um estudo prévio desenvolvido por Zhao *et al.* (2017) também

demonstrou que o tratamento *in vitro* e *in vivo* com outra MnP(MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺) aumentou a expressão gênica e/ou proteica de Cat e SOD em células de medula óssea de camundongos C57BL/6.

Contudo, no presente estudo, as MnPs I e II não foram capazes de aumentar a atividade enzimática reduzida de SOD, catalase e GST causada pelo hipotireoidismo na placenta das ratas, diferentemente de estudos prévios que verificaram o aumento da atividade enzimática de enzimas antioxidantes após o uso de MnPs. Zhang *et al.* (2019), em um estudo *in vitro* com células da adrenal PC12 de rato, demonstraram aumento da atividade de SOD e CAT após tratamento com a Mn-TAT PTD-Ngb, como foi também observado em relação á SOD1 após o pré-tratamento com a MnTM-4-PyP em neurônios corticais primários de rato expostos à H₂O₂ (CHENG *et al.*, 2015). Já Xu *et al.* (2018) demonstraram que o tratamento com a MnTMPyP preserva a atividade de glutathione redutase (GR) em células epiteliais alveolares pulmonares (A549) expostas ao paraquat, um herbicida altamente tóxico. No entanto, vale ressaltar que todos esses estudos foram realizados *in vitro*, diferentemente do presente estudo que além de ser *in vivo* envolve um modelo de doença gestacional, que até o momento não tinha sido utilizado para avaliação das MnPs. É plausível que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas no presente estudo possa ser alcançado, conforme os estudos *in vitro*, utilizando doses maiores das MnPs, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese. Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que os tratamentos com as MnPs I e II, mesmo não aumentando a atividade enzimática placentária de SOD, catalase e GST nas ratas hipotireoideas, foram capazes de proteger contra o estresse oxidativo na interface materno-fetal desses animais, pois não somente reduziram a expressão de HIF1 α e 8-OHdG, como aumentaram a expressão proteica placentária e/ou decidual de SOD1, catalase e GPx1/2 e restauraram a expressão gênica placentária de *Sod1* e *Gpx1*.

Além de avaliar o potencial das MnPs I e II em proteger contra o estresse oxidativo na interface materno-fetal causado pelo hipotireoidismo (SANTOS *et al.*, 2021a), também analisamos seus efeitos protetores contra o estresse de retículo endoplasmático, outro processo biológico envolvido em danos celulares e que pode ser causado pelo estresse oxidativo (XU *et al.*, 2018). Até o momento, o estresse de reticulo endoplasmático não havia sido estudado em modelos *in vivo* avaliando as MnPs, sendo que estudo prévio do nosso grupo tinha demonstrado a ocorrência desse processo na placenta e decídua de ratas hipotireoideas (SANTOS *et al.*, 2021a). Os tratamentos com as MnPs I e II reduziram a maior expressão proteica decidual de GRP78 e CHOP causada pelo hipotireoidismo nas ratas, como

também a expressão gênica placentária de *Chop*, se igualando ao controle. Nossos resultados estão de acordo com estudos *in vitro* de estresse oxidativo que observaram redução da expressão de GRP78 e/ou CHOP após o tratamento com a MnTM-4-PyP em neurônios corticais primários de rato expostos à H₂O₂ (CHENG *et al.*, 2015) e após a administração de MnTMPyP em células de adenocarcinoma pulmonar (A549) expostas ao paraquat (XU *et al.*, 2018). O GRP78 e CHOP são marcadores de ativação de estresse de retículo endoplasmático (RON; HARDING, 2012; WANG; KAUFMAN, 2016) e alguns estudos descreveram o aumento da expressão desses mediadores em doenças gestacionais graves como a pré-eclâmpsia, aborto e RCIU (BURTON; YUNG, 2011; DU *et al.*, 2016; KAWAKAMI *et al.*, 2014; YUNG *et al.*, 2008), demonstrando a importância do presente estudo ao sugerir o efeito protetor das MnPs I e II contra o estresse de retículo endoplasmático na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas.

Considerando que a ativação de estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático pode alterar a expressão de mediadores angiogênicos e imunológicos (HU *et al.*, 2020; KAWAKAMI *et al.*, 2014; ROBB *et al.*, 2017; SOARES; IQBAL; KOZAI, 2017), sendo esses mediadores de vital importância para a função placentária adequada (SANTOS *et al.*, 2021b; SILVA *et al.*, 2017; THAXTON; SHARMA, 2010), avaliou-se também a expressão de VEGF, IL-10 e TNF α . Curiosamente, o tratamento com a MnPI reduziu a maior imunomarcagem de VEGF na zona juncional das ratas hipotireoideas, enquanto ambas as porfirinas não foram capazes de reduzir a maior expressão de VEGF causada pelo hipotireoidismo na decídua e labirinto placentário. O VEGF é um dos principais mediadores pró-angiogênicos na interface materno-fetal, principalmente no primeiro e segundo trimestre da gestação (AHMED *et al.*, 2000). No entanto, a expressão de VEGF também é um indicador de hipóxia, uma vez que é ativado via HIF1 α em ambiente com baixo nível de oxigênio (FERRARA, 2004), sendo que hipóxia foi descrita em placentas pré-eclâmpicas que apresentavam aumento da expressão de HIF1 α e VEGF (SEZER *et al.*, 2013; ALI *et al.*, 2018).

Nesse sentido, a maior expressão proteica de VEGF na decídua e placenta das ratas hipotireoideas está de acordo com a maior expressão gênica e proteica de HIF1 α observada na interface materno-fetal desses animais. Além disso, a redução da expressão de VEGF na zona juncional causada pela MnP I pode ser reflexo da inibição da expressão de HIF1 α causada por essa porfirina nas ratas hipotireoideas. Nossos resultados estão de acordo com Rabbani *et al.* (2009) que também demonstraram redução da expressão de VEGF em um modelo murino de tumor de mama após tratamento com a MnP I, que também foi associado à redução de HIF1 α .

e da hipóxia celular. No entanto, outros estudos demonstraram aumento da expressão de VEGF no tecido muscular de camundongos tratados com MnTBA e submetidos à revascularização em condições de isquemia (ZHOU *et al.*, 2015), como também foi observado por Gauter-Fleckenstein *et al.* (2010) em um modelo de lesão pulmonar induzida por radiação após tratamento com a MnP I. Desse modo, mais estudos são necessários para esclarecer o papel das MnPs na modulação da expressão de VEGF nos sistemas biológicos.

Com relação aos medidores imunológicos, a administração das MnPs I e II aumentou a expressão do TNF α no labirinto placentário e decídua, respectivamente, enquanto na zona juncional as MnPs não alteraram a maior expressão de TNF α causada pelo hipotireoidismo. Diferentemente dos nossos resultados, um estudo *in vitro* demonstrou redução da expressão de TNF α em macrófagos murino (RAW 264.7) expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com MnTBAP (TUMURKHUU *et al.*, 2007), como também foi observado *in vivo* em um modelo de isquemia/reperfusão renal em ratos tratados com a MnTMPyP (LIANG *et al.*, 2008). Por outro lado, ambas as porfirinas reduziram a maior expressão decidual de IL-10 causada pelo hipotireoidismo, se igualando ao grupo controle, como também ocorreu no labirinto placentário com a administração da MnP I. Assim, é plausível que a redução de IL-10 causada pelas MnPs possa ter contribuído para o aumento do TNF α , pois a IL-10 atua principalmente na supressão de citocinas pró-inflamatórias (CHATTERJEE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017; THAXTON; SHARMA, 2010). No entanto, o TNF α também está envolvido na diferenciação e apoptose de células trofoblásticas (SILVA *et al.*, 2017; YELAVARTHI *et al.*, 1991), sugerindo que a administração das MnPs no presente estudo possa estar influenciando esses processos celulares na placenta das ratas hipotireoideas. Além disso, a redução da expressão de IL-10 ao nível do grupo controle causado pelas MnPs sugere uma modulação positiva dessas porfirinas sobre o perfil imunológico placentário nas ratas hipotireoideas. Contudo, mais estudos são necessários sobre a modulação de citocinas inflamatórias na interface materno-fetal pelas MnPs.

Este estudo demonstrou que o tratamento com MnIIIT2EPyP e MnIIIT5B3EPyP melhora o desenvolvimento feto-placentário de ratas hipotireoideas e protege contra a hipóxia, o estresse oxidativo e de retículo endoplasmático causado pelo hipotireoidismo na interface materno-fetal, como também restaura a expressão placentária e/ou decidual de IL-10 e VEGF, sugerindo potenciais alternativas terapêuticas para disfunções gestacionais que cursam com estresse placentário.

REFERÊNCIAS

- ABAD, C.; PROVERBIO, T.; PIÑERO, S.; BOTANA, D.; CHIARELLO, D. I.; MARÍN, R.; PROVERBIO, F. Preeclampsia, Placenta, Oxidative Stress, and PMCA. **Hypertension in Pregnancy**, v. 31, n. 4, p. 427–441, nov. 2012.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, jan. 1984.
- AHMED, A.; DUNK, C.; AHMAD, S.; KHALIQ, A. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen— A Review. **Placenta**, v. 21, n. SUPPL.1, p. S16–S24, 1 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.
- AKISON, L. K.; NITERT, M. D.; CLIFTON, V. L.; MORITZ, K. M.; SIMMONS, D. G. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. **Placenta**, v. 54, p. 52–58, 1 jun. 2017.
- AKMAN, M.; BELISARIO, D. C.; SALAROGLIO, I. C.; KOPECKA, J.; DONADELLI, M.; DE SMAELE, E.; RIGANTI, C. Hypoxia, endoplasmic reticulum stress and chemoresistance: dangerous liaisons. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1–17, 11 jan. 2021.
- ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- ALI, A.; ALEXANDER, S.; KO, P.; CUFFE, J.; WHITEHOUSE, A.; MCGRATH, JJ.; EYLES, D. Developmental Vitamin D Deficiency in Pregnant Rats Does Not Induce Preeclampsia. **Nutrients**, v. 13, n. 12, p. 4254, nov. 2021.
- ALI, L. E.; SALIH, MAGDI M.; ELHASSAN, E. M.; MOHMMED, A. A.; ADAM, I. 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. 2018.
- ALMANZA, A.; CARLESSO, A.; CHINTHA, C.; CREEDICAN, S.; DOULTSINOS, D.; LEUZZI, B.; LUÍS, A.; MCCARTHY, N.; MONTIBELLER, L.; MORE, S.; PAPAIOANNOU, A.; PÜSCHEL, F.; SASSANO, M. L.; SKOKO, J.; AGOSTINIS, P.; DE BELLEROCHE, J.; ERIKSSON, L. A.; FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HEALY, S.; KOZLOV, A.; MUÑOZ-PINEDO, C.; REHM, M.; CHEVET, E.; SAMALI, A. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 2, p. 241–278, jan. 2019.
- AOUACHE, R.; BIQUARD, L.; VAIMAN, D.; MIRALLES, F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1496, maio 2018.

APLIN, J. D.; MYERS, J. E; TIMMS, K.; WESTWOOD, M. Tracking placental development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 9, p. 479–494, 29 jun. 2020.

ARMENGAUD, J. B.; ZYDORCZYK, C.; SIDDEEK, B.; PEYTER, A. C.; SIMEONI, U. Intrauterine growth restriction: Clinical consequences on health and disease at adulthood. **Reproductive Toxicology**, v. 99, p. 168–176, 1 jan. 2021.

ARMISTEAD, B.; KADAM, L.; DREWLO, S.; KOHAN-GHADR, H. R. The Role of NF κ B in Healthy and Preeclamptic Placenta: Trophoblasts in the Spotlight. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1775, 5 mar. 2020.

ARNAUDEAU, S.; ARBOIT, P.; BISCHOF, P.; SHIN-YA, K.; TOMIDA, A. TSURUO, T.; IRION, O.; COHEN, M. Glucose-regulated protein 78: A new partner of p53 in trophoblast. **PROTEOMICS**, v. 9, n. 23, p. 5316–5327, 1 dez. 2009.

BAILEY, K. A.; HAJ, F. G.; SIMON, S. I.; PASSERINI, A. G. Atherosusceptible Shear Stress Activates Endoplasmic Reticulum Stress to Promote Endothelial Inflammation, *Science Reports*, v. 71, n. 7, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08417-9>.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; PAULA, S. O. DE.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul. 2010.

BASTIDA-RUIZ, D.; YART L, WUILLEMIN C, RIBAUUX P, MORRIS N, EPINEY M, MARTINEZ DE TEJADA B, COHEN M. The fine-tuning of endoplasmic reticulum stress response and autophagy activation during trophoblast syncytialization. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 9, p. 1–15, set. 2019.

BASTIDA-RUIZ, D. e WUILLEMIN, C.; PEDERENCINO, A.; YARON, M.; MARTINEZ DE TEJADA, B.; PIZZO, S. V.; COHEN, M. Activated α 2-macroglobulin binding to cell surface GRP78 induces trophoblastic cell fusion. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 15 jun. 2020.

BATINIC-HABERLE, I.; SPASOJEVIC, I.; TSE, H. M.; TOVMASYAN, A.; RAJIC, Z.; CLAIR, D. K. S.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M. W.; PIGANELLI, J. D. Design of Mn porphyrins for treating oxidative stress injuries and their redox-based regulation of cellular transcriptional activities. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p. 95, 2012.

BATINIC-HABERLE, I.; TOVMASYAN, A.; ROBERTS, E.R.H.; VUJASKOVIC, Z.; LEONG, K.W; SPASOJEVIC, I. SOD Therapeutics: Latest Insights into Their Structure-Activity Relationships and Impact on the Cellular Redox-Based Signaling Pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 15, p. 2372, 20 maio 2014.

BATINIĆ-HABERLE, I.; NDENGELE, M.M.; CUZZOCREA, S.; REBOUÇAS, J.S.; SPASOJEVIĆ, I.; SALVEMINI, D. Lipophilicity is a critical parameter that dominates the efficacy of metalloporphyrins in blocking the development of morphine antinociceptive tolerance through peroxynitrite mediated pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 2, p. 212, 15 jan. 2009.

BATINIC-HABERLE, I.; TOVMASYAN, A.; SPASOJEVIC, I. Mn Porphyrin-Based Redox-Active Drugs: Differential Effects as Cancer Therapeutics and Protectors of Normal Tissue Against Oxidative Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 16, p. 1691–1724, 17 out. 2018.

BATINIC-HABERLE, I.; RAJIC, Z.; BENOVIĆ, L. A combination of two antioxidants (an SOD mimic and ascorbate) produces a pro-oxidative effect forcing *Escherichia coli* to adapt via induction of oxyR regulon. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v.11, n. 4, p. 329–340, 2011.

BEZEMER, R. E.; SCHOOTS, M.H.; TIMMER, A.; SCHERJON, S.A.; ERWICH, J.J.H.M.; GOOR, H. VAN.; GORDIJN, S.J.; PRINS, J. R. Altered Levels of Decidual Immune Cell Subsets in Fetal Growth Restriction, Stillbirth, and Placental Pathology. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1898, 20 ago. 2020.

BHANDARY, B.; MARAHATTA, A.; KIM, H.R.; CHAE, H. J. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 434–456, dez. 2012.

BLOIS, S. M.; PRINCE, P.D.; BOROWSKI, S.; GALLEANO, M.; BARRIENTOS, G. Placental Glycoredox Dysregulation Associated with Disease Progression in an Animal Model of Superimposed Preeclampsia. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 800, abr. 2021.

BOTTINO, R.; BALAMURUGAN, A. N.; TSE, H.; THIRUNAVUKKARASU C.; GE, X.; PROFOZICH, J.; MILTON, M.; ZIEGENFUSS, A.; TRUCCO, M.; PIGANELLI, J. D. Response of Human Islets to Isolation Stress and the Effect of Antioxidant Treatment. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2559–2568, 1 out. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BROSENS, I.; PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; ROMERO, R. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 193–201, mar. 2011.

BROSENS, I.; PUTTEMANS, P.; BENAGIANO, G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 221, n. 5, p. 437–456, nov. 2019.

BUDENHOFER, B. K.; DITSCH, N.; JESCHKE, U.; GÄRTNER, R.; TOTH, B. Thyroid (dys-)function in normal and disturbed pregnancy. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 287, n. 1, p. 1–7, 27 out. 2012.

BURDON, C.; MANN, C.; CINDROVA-DAVIES, T.; FERGUSON-SMITH, A.C.; BURTON, G. J. Oxidative Stress and the Induction of Cyclooxygenase Enzymes and Apoptosis in the Murine Placenta. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 724–733, 1 jul. 2007.

BURTON, G. J.; CINDROVA-DAVIES, T.; TURCO, M. Y. 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.; CINDROVA-DAVIES, T.; YUNG, H. wa.; JAUNIAUX, E. HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH: Oxygen and development of the human placenta. **Reproduction**, v. 161, n. 1, p. F53–F65, jan. 2021.

BURTON, G. J.; CINDROVA-DAVIES, T.; TURCO, M. Y. Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy. **Placenta**, v. 102, p. 21–26, 1 dez. 2020.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. The placenta: a multifaceted, transient organ. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1663, p. 20140066, 5 mar. 2015.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Placental Oxidative Stress: From Miscarriage to Preeclampsia. **The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI**, v. 11, n. 6, p. 342–352, dez. 2004.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 1 jun. 2011.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. **Placenta**, v. 60, p. 134–139, 1 dez. 2017.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 2, p. S745–S761, fev. 2018.

BURTON, G. J.; YUNG, H. W. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. **Pregnancy Hypertension Elsevier**, 1(1-2), p. 72-78, jan. 2011.

CARDENAS, E.; GHOSH, R. Vitamin E: A dark horse at the crossroad of cancer management. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 7, p. 845–852, 1 out. 2013.

CARTER, A. M. Placental Oxygen Consumption. Part I: In Vivo Studies—A Review. **Placenta**, v. 21, n. SUPPL.1, p. S31–S37, 1 mar. 2000.

CARTER, A. M.; ENDERS, A. C. Review article. **Theriogenology**, v. 1, n. 86, p. 278–287, 1 jul. 2016.

CHAKRABARTI, S. K.; GHOSH, S.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, S.; CHOWDHURY, S. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 674, set. 2016.

CHAKRABORTY, D.; KARIM RUMI, M. A.; KONNO, T.; SOARES, M. J. Natural killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 39, p. 16295–16300, 27 set. 2011.

CHANG, R. Q.; ZHOU, W.,J.; LI, D. J.; LI, M. Q. Innate Lymphoid Cells at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 6, p. 957, 2020.

CHARNOCK-JONES, D. S. Placental hypoxia, endoplasmic reticulum stress and maternal endothelial sensitisation by sFLT1 in pre-eclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 114, p. 81–85, abr. 2016.

CHATTERJEE, A.; KOSMACEK, E. A.; SHRISHRIMAL, S.; MCDONALD, J. T.; OBERLEY-DEEGAN, R. E. MnTE-2-PyP, a manganese porphyrin, reduces cytotoxicity caused by irradiation in a diabetic environment through the induction of endogenous antioxidant defenses. **Redox Biology**, v. 34, p. 101542, 1 jul. 2020.

CHATTERJEE, P.; CHIASSEON, V. L.; BOUNDS, K. R.; MITCHELL, B. M. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAY, p. 1–1, 2014.

CHAUDHARI, N.; TALWAR, P.; PARIMISSETTY, A.; D'HELLENCOURT, C. L.; RAVANAN, P. A molecular web: Endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. JULY, p. 213, 29 jul. 2014.

CHEN, C. Y.; TSAI, M. M.; CHI, H. C.; LIN, K. H. Biological significance of a thyroid hormone-regulated secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 11, p. 2271–2284, 1 nov. 2013.

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, 16 fev. 2015.

CHENG, S. BIN.; NAKASHIMA, A.; HUBER, W. J.; DAVIS, S.; BANERJEE, S.; HUANG, Z.; SAITO, S.; SADOVSKY, Y.; SHARMA, S. 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 & Disease**, v. 10, n. 12, p. 1–15, dez. 2019.

CHENG, K. Y.; GUO, F.; LU, J. Q.; CAO, Y. Z.; WANG, T. C.; YANG, Q.; XIA, Q. MnTM-4-PyP Modulates Endogenous Antioxidant Responses and Protects Primary Cortical Neurons against Oxidative Stress. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 435–445, 1 maio 2015.

CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 2, p. 139–170, 1 abr. 2010.

CHOI, S. J.; OH, S. YOUNG.; KIM, J. H.; ROH, C. R. Changes of nuclear factor kappa B (NF-κB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human myometrium before and during term labor. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 132, n. 2, p. 182–188, 1 jun. 2007.

CHOKSI, N. Y.; JAHNKE, G. D.; HILAIRE, C. S.T.; SHELBY, M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 6, p. 479–491, 1 dez. 2003.

CHRISTIAENS, I.; ZARAGOZA, D. B.; GUILBERT, L.; ROBERTSON, S. A.; MITCHELL, B. F.; OLSON, D. M. Inflammatory processes in preterm and term parturition. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 1, p. 50–57, 1 out. 2008.

CINDROVA-DAVIES, T.; TISSOT, VAN PATOT. M.; GARDNER, L.; JAUNIAUX, E.; BURTON, G. J.; CHARNOCK-JONES, D. S. Energy status and HIF signalling in chorionic villi show no evidence of hypoxic stress during human early placental development. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 296–308, 1 mar. 2015.

CROSS, J. C. How to make a placenta: Mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice – A Review. **Placenta**, v. 26, n. SUPPL., p. S3–S9, 1 abr. 2005.

DEY, S.; SIDOR, A.; O'ROURKE, B. Compartment-specific Control of Reactive Oxygen Species Scavenging by Antioxidant Pathway Enzymes *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 21, p. 11185–11197, 20 maio 2016.

DU, L.; HE, F.; KUANG, L.; TANG, W.; LI, Y.; CHEN, D. eNOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. **Journal of Human Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 49–55, 31 mar. 2016.

DUFÉY, E.; SEPÚLVEDA, D.; ROJAS-RIVERA, D.; HETZ, C. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 307, n. 7, p. C582–C594, 1 out. 2014.

DUNK, C. KWAN M, HAZAN A, WALKER S, WRIGHT JK, HARRIS LK, JONES RL, KEATING S, KINGDOM JCP, WHITTLE W, et al. Failure of decidualization and maternal immune tolerance underlies uterovascular resistance in intra uterine growth restriction. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. MAR, p. 160, 2019.

DUNWOODIE, S. L. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. **Developmental Cell**, v. 17, n. 6, p. 755–773, 15 dez. 2009.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **American Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 29–67, 1 jan. 1965.

FAAS, M. M.; DE VOS, P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. **Placenta**, v. 56, p. 44–52, 1 ago. 2017.

FARIA, M. R.; HOSHIDA, M. S.; FERRO, E. A.V.; IETTA, F.; PAULESU, L.; BEVILACQUA, E. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 4 ago. 2010.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 1 ago. 2004.

FIGUEROA-MÉNDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. DEC, p. 397, 2015.

FISHER, S. J. Why is placentation abnormal in preeclampsia? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 213, n. 4 0, p. S115, 1 out. 2015.

FOLLI, F.; CORRADI, D.; FANTI, P.; DAVALLI, A.; PAEZ, A.; GIACCARI, A.; PEREGO, C.; MUSCOGIURI, G. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Micro- and Macrovascular Complications: Avenues for a Mechanistic-Based Therapeutic Approach. **Current Diabetes Reviews**, v. 7, n. 5, p. 313–324, 12 set. 2012.

FONSECA, T. L.; CORREA-MEDINA, M.; CAMPOS, M. P. O.; WITTMANN, G.; WERNECK-DE-CASTRO, J. P.; DRIGO, R. A.; MORA-GARZON, M.; UETA, C. B.; CAICEDO, A.; FEKETE, C. Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 4, p. 1492–1500, 1 abr. 2013.

FORHEAD, A. J.; FOWDEN, A. L. Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, p. R87–R103, jun. 2014.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine regulation of fetal metabolism towards term. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 78, p. 106657, 1 jan. 2022.

FRADET, S.; PIERREDON, S.; RIBAU, P.; EPINEY, M.; YA, K.; IRION, O.; COHEN, M. Involvement of Membrane GRP78 in Trophoblastic Cell Fusion. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e40596, 9 ago. 2012.

FRANCISQUETI-FERRON, F. V. FERRON AJT, GARCIA JL, ALMEIDA SILVA CCV DE, COSTA MR, GREGOLIN CS, MORETO F, FERREIRA ALA, MINATEL IO, CORREA CR. Basic Concepts on the Role of Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2 (Nrf2) in Age-Related Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3208, jun. 2019.

FULLERTON, P. T.; MONSIVAIS, D.; KOMMAGANI, R.; MATZUK, M. M. Follistatin is critical for mouse uterine receptivity and decidualization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 24, p. E4772–E4781, 13 jun. 2017.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–18, 2014.

FURUKAWA, S.; TSUJI, N.; SUGIYAMA, A. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 1, p. 1, 2019.

GARGALOVIC, P. S.; GHARAVI, N. M.; CLARK, M. J.; PAGNON, J.; YANG, W. P.; HE, A.; TRUONG, A.; BARUCH-OREN, T.; BERLINER, J. A.; KIRCHGESSNER, T. G. et al. The Unfolded Protein Response Is an Important Regulator of Inflammatory Genes in Endothelial Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 11, p. 2490–2496, 1 nov. 2006.

GAUTER-FLECKENSTEIN, B.; FLECKENSTEIN, K.; OWZAR, K.; JIANG, C.; REBOUÇAS, J. S.; BATINIC-HABERLE, I.; VUJASKOVIC, Z. et al. Early and late administration of MnTE-2-PyP5+ in mitigation and treatment of radiation-induced lung damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 8, p. 1034–1043, 20 jan. 2010.

GELLERSEN, B.; BROSENS, J. J. Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 6, p. 851–905, 1 dez. 2014.

GEORGE, E. M.; HOSICK, P. A.; STEC, D. E.; GRANGER, J. P. Heme Oxygenase Inhibition Increases Blood Pressure in Pregnant Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 7, p. 924, jul. 2013.

GEORGE, E. M. COCKRELL, K.; ARANY, M.; STEC, D.E.; RIMOLDI, J.M.; GADEPALLI, R. S. V.; GRANGER, J. P. Carbon Monoxide Releasing Molecules Blunt Placental Ischemia-Induced Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 30, n. 9, p. 931, 1 set. 2017.

GHOSH, R. LIPSON KL, SARGENT KE, MERCURIO AM, HUNT JS, RON D, URANO F. Transcriptional Regulation of VEGF-A by the Unfolded Protein Response Pathway. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 8 mar. 2010.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 29 out. 2010.

GUI, J.; XU, W.; ZHANG, J. Association between thyroid dysfunction and perinatal outcomes in women with gestational hypertension: A retrospective study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 20, n. 1, p. 1–9, fev. 2020.

GUZEL, E.; ARLIER, S.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; TABAK, M. S.; EKIZ, T.; SEMERCI, N.; LARSEN, K.; SCHATZ, F.; LOCKWOOD, C. J.; KAYISLI, U. A. Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 792, 8 abr. 2017.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HAN, J.; BACK, S. H; HUR, J.; LIN, Y. H.; GILDERSLEEVE, R.; SHAN, J.; YUAN, C. L.; KROKOWSKI, D.; WANG, S.; HATZOGLOU, M. et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 481–490, 28 abr. 2013.

HANSSON, S. R.; NÄÄV, Å.; ERLANDSSON, L. Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. JAN, p. 516, 2015.

HARDIN, P. E.; HALL, J. C.; ROSBASH, M. Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 24, p. 11711–11715, 15 dez. 1992.

HARMON, Q. E.; HUANG, L.; UMBACH, D. M.; KLUNGSØYR, K.; ENGEL, S. M.; MAGNUS, P.; SKJÆRVEN, R.; ZHANG, J.; WILCOX, A. J. et al. Risk of Fetal Death With

Preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 125, n. 3, p. 628, mar. 2015.

HARRIS, L. K. IFPA Gabor Than Award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: Key events in the remodelling timeline. **Placenta**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. S154–S158, 1 mar. 2011.

HAYDER, H.; O'BRIEN, J.; NADEEM, U.; PENG, C. MicroRNAs: crucial regulators of placental development. **Reproduction**, v. 155, n. 6, p. R259–R271, 1 jun. 2018.
HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, L.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 1 dez. 2017.

HE, W. Y.; Chen, G. J.; Lai, X.; Wu, F.; Tang, C. S.; Zhang, A.H. Expression levels of urotensin II are associated with endoplasmic reticulum stress in patients with severe preeclampsia. **Journal of Human Hypertension**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 16 abr. 2015.

HERNANDEZ, I.; FOURNIER, T.; CHISSEY, A.; THEROND, P.; SLAMA, A.; BEAUDEUX, J.L.; ZERRAD-SAAD, A. NADPH oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: association with MAPK pathway activation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 27 set. 2019.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Molecular Cell**, v. 69, n. 2, p. 169–181, 18 jan. 2018.

HU, C.; YANG, Y.; DENG, M.; YANG, L.; SHU, G.; JIANG, Q.; ZHANG, S.; LI, X.; YIN, Y.; YIN, Y.; et al. Placentae for Low Birth Weight Piglets Are Vulnerable to Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Impaired Angiogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

HUANG, S.; XING, Y.; LIU, Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 α in metabolic regulation and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 49, p. 18726–18741, 6 dez. 2019.

HULBERT, A. J. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. **Biological Reviews**, v. 75, n. 4, p. 519–631, 1 nov. 2000.

HUNG, T. 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, 1 set. 2006.

HUPPERTZ, B.; KADYROV, M.; KINGDOM, J. C. P. Apoptosis and its role in the trophoblast. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 195, n. 1, p. 29–39, 1 jul. 2006.

IDRIS, I.; SRINIVASAN, R.; SIMM, A.; PAGE, R. C. Maternal hypothyroidism in early and late gestation: effects on neonatal and obstetric outcome. **Clinical Endocrinology**, v. 63, n. 5, p. 560–565, 2005.

IWAWAKI, T.; AKAI, R.; YAMANAKA, S.; KOHNO, K. Function of IRE1 α in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, v. 106, n. 39, p. 16657–16662, 29 set. 2009.

JAFFE, R.; JAUNIAUX, E.; HUSTIN, J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta—Myth or reality? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, n. 3, p. 695–705, 1 mar. 1997.

JAIN, A.; OLOVSSON, M.; BURTON, G. J.; YUNG, H. W. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP 3 pathway: Implications for placental pathophysiology in preeclampsia. **American Journal of Pathology**, v. 180, n. 6, p. 2309–2320, 1 jun. 2012.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.L.; HEMPSTOCK, J.; BAO, Y. P.; SKEPPER, J. N.; BURTON, G. J. Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress: A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure. **The American Journal of Pathology**, v. 157, n. 6, p. 2111–2122, 1 dez. 2000.

JAUNIAUX, E.; BURTON, G. J. Pathophysiology of Placenta Accreta Spectrum Disorders: A Review of Current Findings. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 61, n. 4, p. 743–754, 1 dez. 2018.

JIA, N.; LI, J. Human Uterine Decidual NK Cells in Women with a History of Early Pregnancy Enhance Angiogenesis and Trophoblast Invasion. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

JIAO, Y. WANG Y, GUO S, WANG G. Glutathione peroxidases as oncotargets. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 80093, 2017.

JONES, C. J. P.; CHOUDHURY, R. H.; APLIN, J. D. Tracking nutrient transfer at the human maternofetal interface from 4 weeks to term. **Placenta**, v. 36, n. 4, p. 372–380, 1 abr. 2015.

JUNGSUWADEE, P.; WEAVER, M. R.; GALLY, F.; OBERLEY-DEEGAN, R.E. The Metalloporphyrin Antioxidant, MnTE-2-PyP, Inhibits Th2 Cell Immune Responses in an Asthma Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9785–9797, 6 ago. 2012.

KAELEN, 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.; NEVERS, T.; NORRIS, W. E.; SHARMA, S. Vascular IL-10: A protective role in preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 88, n. 2, p. 165–169, mar. 2011.

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.

KAWAKAMI, T.; YOSHIMI, M.; KADOTA, Y.; INOUE, M.; SATO, M.; SUZUKI, S. Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 275, n. 2, p. 134–144, 1 mar. 2014.

KAZEMI, N. Y.; FEDYSHYN, B.; YELSA, I.; FEDYSHYN, Y.; RUANO, R.; MARKOVIC, S. N.; CHAKRABORTY, R.; ENNINGA, E. A. L. Increased cell-free fetal DNA release after apoptosis and sterile inflammation in human trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 86, n. 5, p. e13483, 1 nov. 2021.

KENCHEGOWDA, D.; NATALE, B.; LEMUS, M. A.; NATALE, D. R.; FISHER, S. A. Inactivation of maternal Hif-1 α at mid-pregnancy causes placental defects and deficits in oxygen delivery to the fetal organs under hypoxic stress. **Developmental Biology**, v. 422, n. 2, p. 171–185, 15 fev. 2017.

KENT, N. L.; ATLURI, S. C.; CUFFE, J. S. M. Maternal hypothyroidism in rats reduces placental lactogen, lowers insulin levels and causes glucose intolerance. **Endocrinology**, 16 nov. 2021.

KIMBALL, R.; WAYMENT, M.; MERRILL, D.; WAHLQUIST, T.; REYNOLDS, P. R.; ARROYO, J. A. Hypoxia reduces placental mTOR activation in a hypoxia-induced model of intrauterine growth restriction (IUGR). **Physiological Reports**, v. 3, n. 12, p. e12651, 1 dez. 2015.

KNÖFLER, M.; HAIDER, S.; SALEH, L.; POLLHEIMER, J.; GAMAGE, T. H. B.; JAMES, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.76, n. 18, p. 3479-3496, 2019.

KOREVAAR, T. I. M.; KOREVAAR, T. I. M.; MEDICI, M.; VISSER, T. J.; PEETERS, R. P. Thyroid disease in pregnancy: new insights in diagnosis and clinical management. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 610–622, ago. 2017.

KRASSAS, G. E. Thyroid disease and female reproduction. **Fertility and sterility**, v. 74, n. 6, p. 1063–1070, 2000.

KRASSAS, G. E.; POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid function and human reproductive health. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 5, p. 702-755, out. 2010.

KUMAR, S. N.; BASTIA, B.; BORGOHAIN, D.; AGRAWAL, U.; RAISUDDIN, S.; JAIN, A. K. Structural changes, increased hypoxia, and oxidative DNA damage in placenta due to maternal smokeless tobacco use. **Birth Defects Research**, v. 113, n. 16, p. 1198–1214, 1 out. 2021.

KURLAK, L. O.; MISTRY, H. D.; KAPTEIN, E.; VISSER, T. J.; BROUGHTON PIPKIN, F. Thyroid hormones and their placental deiodination in normal and pre-eclamptic pregnancy. **Placenta**, v. 34, n. 5, p. 395–400, 1 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.

LAIN, K. Y.; ROBERTS, J. M. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. **JAMA**, v. 287, n. 24, p. 3183–3186, 1 jun. 2002.

LAPPAS, M.; HIDEN, U.; DESOYE, G.; FROEHLICH, J.; MOUZON, S. H. DE.;

JAWERBAUM, A. The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 12, p. 3061–3100, 31 out. 2011.

LARIJANI, B.; MARSOOSI, V.; AGHAKHANI, S.; MORADI, A.; HASHEMIPOUR, S. Thyroid hormone alteration in pre-eclamptic women. **Gynecological Endocrinology**, v. 18, n. 2, p. 97–100, fev. 2009.

LARSEN, P. THYROID-PITUITARY INTERACTION: FEEDBACK REGULATION OF THYROTROPIN SECRETION BY THYROID HORMONES. **The New England Journal of Medicine**, v. 306, p. 23-32, 1982.

LEE, C. L.; VEERBEEK, J. H.W.; RANA, T.K.; RIJN, B. B.; VAN.; BURTON, G.J.; YUNG, H.W. 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, 1 fev. 2019.

LEE, E. J.; CÁRDENES, N.; ÁLVAREZ, D.; SELLARÉS, J.; SEMBRA, T. J.; ARANDA, P.; PENG, Y.; BULLOCK, J.; NOURAI, S. M.; MORA, A. L. et al. Mesenchymal stem cells reduce ER stress via PERK-Nrf2 pathway in an aged mouse model. **Respirology**, v. 25, n. 4, p. 417–426, 1 abr. 2020.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: In a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 102, n. 3, p. 122–134, 15 jul. 1994.

LI, W.; CAO, T.; LUO, C.; CAI, J.; ZHOU, X.; XIAO, X.; LIU, S. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6129–6140, 24 maio 2020.

LI, Y.; SHAN, Z.; TENG, W.; YU, X.; LI, Y.; FAN, C.; TENG, X.; GUO, R.; WANG, H.; LI, J. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25–30 months. **Clinical ENDOCRINOLOGY**, V. 72, N. 6, P. 825–829, 1 JUN. 2010.

LIAN, I. A.; LØSET, M.; MUNDAL, S. B.; FENSTAD, M. H.; JOHNSON, M. P.; EIDE, I. P.; BJØRGE, L.; FREED, K. A.; MOSES, E. K.; AUSTGULEN, R. 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.

LIANG, H. L.; HILTON, G.; MORTENSEN, J.; REGNER, K.; JOHNSON, C. P.; NILAKANTAN, V. MnTMPyP, a cell-permeant SOD mimetic, reduces oxidative stress and apoptosis following renal ischemia-reperfusion. **American Journal of physiologyRenal Physiology**, v. 296, n. 2, p. F266-76, 17 dez. 2008.

LIONG, S.; LAPPAS, M. Endoplasmic reticulum stress is increased after spontaneous labor in human fetal membranes and myometrium where it regulates the expression of prolabor mediators. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, p. 70–71, 1 set. 2014.

LIU, D.; XUE, J.; LIU, Y.; GU, H.; WEI, X.; MA, W.; LUO, W.; MA, L.; JIA, S.; DONG, N. et al. Inhibition of NRF2 signaling and increased reactive oxygen species during

embryogenesis in a rat model of retinoic acid-induced neural tube defects. **NeuroToxicology**, v. 69, p. 84–92, dez. 2018.

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, L.; SIMON, M. C. Regulation of Transcription and Translation by Hypoxia. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, n. 6, p. 492–497, 2004.

LOBODA, A.; DAMULEWICZ, M.; PYZA, E.; JOZKOWICZ, A.; DULAK, J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 17, p. 3221, 1 set. 2016.

LONGCOPE, C. The male and female reproductive systems in hypothyroidism. **The thyroid: a fundamental and clinical text**, p. 1052–1055, 1991.

LORENZON-OJEA, A. R.; YUNG, H. W.; BURTON, G. J.; BEVILACQUA, E. The potential contribution of stromal cell-derived factor 2 (SDF2) in endoplasmic reticulum stress response in severe preeclampsia and labor-onset. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 2, p. 165386, 1 fev. 2020.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 21 ago. 2011.

LUCAS, E. S.; VRLJICAK, P.; MUTER, J.; DINIZ-DA-COSTA, M. M.; BRIGHTON, P. J.; KONG, C. S.; LIPECKI, J.; FISHWICK, K. J.; ODENDAAL, J.; EWINGTON, L. J. et al. Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 21 jan. 2020.

LYALL, F.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction relationship to clinical outcome. **Hypertension**, v. 62, n. 6, p. 1046–1054, 2013.

M. RESLAN, O.; A. KHALIL, R. Molecular and Vascular Targets in the Pathogenesis and Management of the Hypertension Associated with Preeclampsia. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 204–226, 5 set. 2010.

MAILLOUX, R. J. An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 472, jun. 2020.

MANCINI, A.; RAIMONDO, S.; SEGNI, C. DI.; PERSANO, M.; GADOTTI, G.; SILVESTRINI, A.; FESTA, R.; TIANO, L.; PONTECORVI, A.; MEUCCI, E. Thyroid Hormones and Antioxidant Systems: Focus on Oxidative Stress in Cardiovascular and Pulmonary Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 23893, 9 dez. 2013.

MANCINI, A.; SEGNI, C. DI.; RAIMONDO, S.; OLIVIERI, G.; SILVESTRINI, A.;

MEUCCI, E.; CURRÒ, D. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MENG, L.; RIJNTJES, E.; SWARTS, H.; BUNSCHOTEN, A.; STELT, I. VAN DER.; KEIJER, J.; TEERDS, K. 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, 2016.

MICHALAK, M.; GYE, M. C. Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 1, p. 1, 2015.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBS letters**, v. 586, n. 5, p. 585, 9 mar. 2012.

MISHRA, P.; PAITAL, B.; JENA, S.; SWAIN, S. S.; KUMAR, S.; YADAV, M. K.; CHAINY, G. B. N.; SAMANTA, L. Possible activation of NRF2 by Vitamin E/Curcumin against altered thyroid hormone induced oxidative stress via NFκB/AKT/mTOR/KEAP1 signalling in rat heart. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 15 maio 2019.

MISTRY, H. D.; WILLIAMS, P. J. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011.

MIZUUCHI, M.; Cindrova-Davies, T.; Olovsson, M.; Charnock-Jones, D. S.; Burton, G. J.; Yung, H. W. Placental endoplasmic reticulum stress negatively regulates transcription of placental growth factor via ATF4 and ATF6β: implications for the pathophysiology of human pregnancy complications. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 4, p. 550–561, 1 mar. 2016.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–663, set. 2002.

MOLDENHAUER, J. S. STANEK J, WARSHAK C, KHOURY J, SIBAI B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 4, p. 1173–1177, 1 out. 2003.

MOSER, G.; WEISS, G.; GAUSTER, M.; SUNDL, M.; HUPPERTZ B. Evidence from the very beginning: endoglandular trophoblasts penetrate and replace uterine glands in situ and in vitro. **Human Reproduction**, v. 30, n. 12, p. 2747–2757, 1 dez. 2015.

MOSER, G. SUNDL, M.; LICHTENSTEINER, M.; WEISS, G.; HUPPERTZ, B. et al. A revised picture of extravillous trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Health and Medicine**, v. 2, p. S9–S14, 1 dez. 2016.

NUZZO, A. M.; CAMM, E. J.; SFERRUZZI-PERRI, A. N.; ASHMORE, T. J.; YUNG, H. WA.; CINDROVA-DAVIES, T.; SPIROSKI, A. M.; SUTHERLAND, M. R.; LOGAN, A.; AUSTIN-WILLIAMS, S. et al. Placental Adaptation to Early-Onset Hypoxic Pregnancy and Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapy in a Rodent Model. **The American Journal of**

Pathology, v. 188, n. 12, p. 2704–2716, 1 dez. 2018.

OBERLEY-DEEGAN, R. E.; STEFFAN, J. J.; ROVE, K. O.; PATE, K.M.; WEAVER, M. W.; SPASOJEVIC, I.; FREDERICK, B.; RABEN, D.; MEACHAM, R. B.; CRAPO, J. D. et al. The Antioxidant, MnTE-2-PyP, Prevents Side-Effects Incurred by Prostate Cancer Irradiation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44178, 12 set. 2012.

OLSON, D. M. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 5, p. 717–730, 1 out. 2003.

OLSON, K. R.; GAO, Y.; STEIGER, A. K.; PLUTH, M. D.; TESSIER, C. R.; MARKEL, T. A.; BOONE, D.; STAHELIN, R. V.; BATINIC-HABERLE, I.; STRAUBG, K. D. Effects of Manganese Porphyrins on Cellular Sulfur Metabolism. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 980, 22 fev. 2020.

OLTRA, L.; Reverte, V.; Garcés, B.; Li, Volti, G.; Moreno, J. M.; Salazar, F. J.; Llinás, M. T. Trophoblast-induced spiral artery remodelling and uteroplacental haemodynamics in pregnant rats with increased blood pressure induced by heme oxygenase inhibition. **Placenta**, v. 89, p. 91–98, 1 jan. 2020.

ONOGI, A.; NARUSE, K.; SADO, T.; TSUNEMI, T.; SHIGETOMI, H.; NOGUCHI, T.; YAMADA, Y.; AKASAKI, M.; OI, H.; KOBAYASHI, H. Hypoxia inhibits invasion of extravillous trophoblast cells through reduction of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation in the early first trimester of human pregnancy. **Placenta**, v. 32, n. 9, p. 665–670, 1 set. 2011.

OWAKI, Y.; WATANABE, K.; IWASAKI, A.; SAITOU, T.; MATSUSHITA, H.; WAKATSUKI, A. Placental hypoplasia and maternal organic vascular disorder in pregnant women with gestational hypertension and preeclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 34, n. 3, p. 353–359, 2019.

PEREIRA, R. D.; Long, N. E. De.; Wang, R. C.; Yazdi, F. T.; Holloway, A. C.; Raha, S. Angiogenesis in the placenta: The role of reactive oxygen species signaling. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; HANSSENS, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. **Placenta**, v. 27, n. 9–10, p. 939–958, 1 set. 2006.

PLAISIER, M. Decidualisation and angiogenesis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 259–271, 1 jun. 2011.

POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 149–161, 1 mar. 2003.

QI, L.; JIANG, J.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; WANG, T. Curcumin Protects Human Trophoblast HTR8/SVneo Cells from H₂O₂-Induced Oxidative Stress by Activating Nrf2 Signaling Pathway. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 121, 1 fev. 2020.

RABBANI, Z. N.; Spasojevic, I.; Zhang, X.; Moeller, B. J.; Haberle, S.; Vasquez-Vivar, J.;

Dewhirst, M. W.; Vujaskovic, Z.; Batinic-Haberle, I. Antiangiogenic action of redox-modulating Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, MnTE-2-PyP(5+), via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 7, p. 992–1004, 8 jul. 2009.

RAIJMAKERS, M. T. M.; DECHEND, R.; POSTON, L. Oxidative Stress and Preeclampsia. **Hypertension**, v. 44, n. 4, p. 374–380, 1 out. 2004.

RATCLIFFE, P.; KOIVUNEN, P.; MYLLYHARJU, J.; RAGOISSIS, J.; BOVÉE, J. V.; BATINIC-HABERLE, I.; VINATIER, C.; TRICHET, V.; ROBRIQUET, F.; OLIVER, L. et al. Update on hypoxia-inducible factors and hydroxylases in oxygen regulatory pathways: from physiology to therapeutics. **Hypoxia**, v. 5, p. 11, mar. 2017.

REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Placental Stress and Pre-eclampsia: A Revised View. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 38–42, mar. 2009.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L.; STAFF, A. C. IFPA Senior Award Lecture: Making sense of pre-eclampsia – Two placental causes of preeclampsia? **Placenta**, v. 35, n. SUPPL, p. S20–S25, fev. 2014.

REITER, R. J.; MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; ALATORRE-JIMENEZ, M.; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, 1 out. 2016.

RENAUD, S. J.; SCOTT, R. L.; CHAKRABORTY, D.; RUMI, M. A. K.; SOARES, M. J. 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.; BOROWICZ, P. P.; CATON, J. S.; VONNAHME, K. A.; LUTHER, J. S.; BUCHANAN, D.S.; HAFEZ, S. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 355–365, 11 nov. 2009.

RINDLER, P. M. .; PLAFKER, S. M.; SZWEDA, L. I.; KINTER, M. High Dietary Fat Selectively Increases Catalase Expression within Cardiac Mitochondria *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 1979–1990, 18 jan. 2013.

ROBB, K. P.; Cotechini, T.; Allaire, C.; Sperou, A.; Graham, C. H. Inflammation-induced fetal growth restriction in rats is associated with increased placental HIF-1 α accumulation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2017.

ROBERTS, J. M.; HUBEL, C. A. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? **The Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 788–789, 4 set. 1999.

ROBERTS, J. M.; REDMAN, C. W. G. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. **The Lancet**, v. 341, n. 8858, p. 1447–1451, 5 jun. 1993.

RODRIGUEZ, D.; ROJAS-RIVERA, D.; HETZ, C. Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 4, p. 564–574, 1 abr. 2011.

RON, D.; HARDING, H. P. Protein-Folding Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum and Nutritional Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 12, p. a013177, 1 dez. 2012.

ROSARIO, G. X.; KONNO, T.; SOARES, M. J. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. *Developmental Biology*, v. 314, n. 2, p. 362–375, fev. 2008.

SABA, H.; BATINIC-HABERLE, I.; MUNUSAMY, S.; MITCHELL, T.; LICHTI, C.; MEGYESI, J.; MACMILLAN-CROW, L. A. Manganese porphyrin reduces renal injury and mitochondrial damage during ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1571–1578, 15 maio 2007.

SAHOO, D. K.; Roy, A.; Bhanja, S.; Chainy, G. B. N. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 63–70, mar. 2008.

SAJADIAN, M.; HASHEMI, M.; SALIMI, S.; NAKHAEI, A. The Effect of Experimental Thyroid Dysfunction on Markers of Oxidative Stress in Rat Pancreas. **Drug Development Research**, v. 77, n. 4, p. 199–205, jun. 2016.

SANTOS, B. R.; CORDEIRO, J. M. DOS A; SANTOS, L. C.; SANTOS, E. O.; OLIVEIRA, L. S. DE.; BARBOSA, E. M.; MACEDO, I. O.; SARMENTO-NETO, J. F.; REBOUÇAS, J. S.; SILVA, G. DE F.; SILVA, J. S. Manganese porphyrin-based treatment blocks placental stress caused by maternal hypothyroidism and improves placental morphogenesis and fetal development in a rat experimental model. XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology. **Anais...São Paulo: Brazilian Society for Cell Biology**, 2021a.

SANTOS, L. C. SANTOS LC, ANJOS CORDEIRO JM DOS, SANTANA L DA S, SANTOS BR, BARBOSA EM, SILVA TQM DA, CORRÊA JMX, NIELLA RV, LAVOR MSL, SILVA EB DA.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R.; SILVA, J. F. Kisspeptin/Kiss1r system and angiogenic and immunological mediators at the maternal-fetal interface of domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 105, n. 1, p. 217–231, 2 jul. 2021b.

SCHMITZ, M. L.; SHABAN, M.S.; ALBERT, B. V.; GÖKÇEN, A.; KRACHT, M. The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF- κ B: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, 1 jun. 2018.

SCHOOTS, M. H.; GORDIJN, S. J.; SCHERJON, S. A.; GOOR, H. VAN.; HILLEBRANDS, J. L. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153–161, set. 2018.

SEZER, S. D.; KÜÇÜK, M.; DÖGER, F. K.; YÜKSEL, H.; ODABAŞI, A. R.; TÜRKMEN, M. K.; ÇAKMAK, B.Ç.; ÖMÜRLÜ, I. K.; KINAŞ, M. G. VEGF, PIGF and HIF-1 α in placentas of early- and late-onset pre-eclamptic patients. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 8, p. 797–800, ago. 2013.

SHAHNAWAZ, S.; NAWAZ, U. S.; ZAUGG, J.; HUSSAIN, G.; MALIK, N.; DOGAR, M. Z.H.; MALIK, S. A.; ALBRECHT, C. Dysregulated Autophagy Leads to Oxidative Stress and Aberrant Expression of ABC Transporters in Women with Early Miscarriage. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1742, 30 out. 2021.

SHARMA, D.; SHASTRI, S.; SHARMA, P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. **Clinical Medicine Insights Pediatrics**, v. 10, p. 67, jan. 2016.

SHARMA, S. Natural killer cells and regulatory T cells in early pregnancy loss. **International Journal of Developmental Biology**, v. 58, n. 2-3-4, p. 219-229, 10 jul. 2014.

SHARMA, S.; Gupta, N.; Jamwal, S.; Sharma, A. ASSOCIATION OF DUAL ENDOCRINOPATHY WITH SEVERITY OF PREECLAMPSIA - A prospective observational study. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 1867-1877, 31 mar. 2021.

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.

SHENG, Y.; ABREU, I. A.; CABELLI, D. E.; MARONEY, M. J.; MILLER, A. F.; TEIXEIRA, M.; VALENTINE, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3854-3918, abr. 2014.

SHRISHRIMAL, S.; CHATTERJEE, A.; KOSMACEK, E. A.; DAVIS, P. J.; MCDONALD, J. T.; OBERLEY-DEEGAN, R.E. Manganese porphyrin, MnTE-2-PyP, treatment protects the prostate from radiation-induced fibrosis (RIF) by activating the NRF2 signaling pathway and enhancing SOD2 and sirtuin activity. **Free radical biology & medicine**, v. 152, p. 255, 20 maio 2020.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613-619, 1 abr. 2017.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 27 jun. 2017.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 923-931, 2012.

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, 4 set. 2017.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 803-816, 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. 226-234, 1 mar. 2015.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 907-921, 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, 3 mar. 2016.

SMITH, M. H.; PLOEGH, H. L.; WEISSMAN, J. S. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1086–1090, 25 nov. 2011.

SMITH, S. D.; DUNK, C. E.; APLIN, J. D.; HARRIS, L. K.; JONES, R. L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1959–1971, 2009.

SOARES, M. J.; CHAKRABORTY, D.; KARIM RUMI, M. A.; KONNO, T.; RENAUD, S. J. RAT PLACENTATION: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta**, v. 33, n. 4, p. 233, abr. 2012.

SOARES, M. J.; CHAKRABORTY, D.; KUBOTA, K.; RENAUD, S. J.; KARIM RUMI, M. A. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy. **The International journal of developmental biology**, v. 58, n. 0, p. 247, 2014.

SOARES, M. J.; IQBAL, K.; KOZAI, K. Hypoxia and Placental Development. **Birth Defects Research**, v. 109, n. 17, p. 1309–1329, 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.; THIELE, K.; KOWAL, M. K.; ARCK, P. C. Identification of suitable reference genes in the mouse placenta. **Placenta**, v. 39, p. 7–15, 1 mar. 2016.

SONG, W.; CHANG, W. L.; SHAN, D.; GU, Y.; GAO, L.; LIANG, S.; GUO, H.; YU, J.; LIU, X. 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.

SONG, W.; HU, P.; GUO, S.; HU, J.; SONG, C.; WANG, T.; GAO, Z.; YUE, T. Oxidative stress and endoplasmic reticulum stress contribute to *L. paracasei* subsp. *paracasei* M5L exopolysaccharide-induced apoptosis in HT-29 cells. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 3, p. 1676, 1 mar. 2021.

SOUZA, C. A.; SILVA, J. F.; SILVA, C. L. R.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones affect decidualization and angiogenesis in the decidua and metrial gland of rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 9, p. 1002–1014, 1 set. 2017.

SOUZA, C. A.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SILVA, C. L. R.; GOMES, L. A.; ASSUNÇÃO, G. S. M.; SILVA, C. M. O.; OLIVEIRA, K. P.; SERAKIDES, R. 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, 3 abr. 2020.

STYNE, D. M. Puberty and its Disorders in Boys. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 20, n. 1, p. 43–69, 1 mar. 1991.

TABAS, I.; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 184–190, 1 mar. 2011.

THANGARATINAM, S.; TAN, A.; KNOX, E.; KILBY, M. D.; FRANKLYN, J.; Coomarasamy, A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. **BMJ**, v. 342, n. 7806, 9 maio 2011.

THAXTON, J. E.; SHARMA, S. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 63, n. 6, p. 482, jun. 2010.

TIANTHONG, W.; PHUPONG, V. Serum hypoxia-inducible factor-1 α and uterine artery Doppler ultrasound during the first trimester for prediction of preeclampsia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 23 mar. 2021.

TUMURKHUU, G.; KOIDE, N.; DAGVADORJ, J.; HASSAN, F.; ISLAM, S.; NAIKI, Y.; MORI, I.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. MnTBAP, a synthetic metalloporphyrin, inhibits production of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells via inhibiting oxidative stress-mediating p38 and SAPK/JNK signaling. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 304–311, 1 mar. 2007.

UNSAL, V.; DALKIRAN, T.; ÇIÇEK, M.; KÖLÜKÇÜ, E. The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity: A Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 184, 2020.

URBANIAK, S. K.; BOGUSZEWSKA, K.; SZEWCZUK, M.; KÁZMIERCZAK-BARAŃSKA, J.; KARWOWSKI, B. T. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 202, 3 jan. 2020.

VARVARIGOU, A. A. Intrauterine growth restriction as a potential risk factor for disease onset in adulthood. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 215–224, 1 mar. 2010.

VEERBEEK, J. H. W.; TISSOT VAN PATOT., M. C.; BURTON, G. J.; YUNG, H. W. Endoplasmic reticulum stress is induced in the human placenta during labour. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 88–92, jan. 2015.

VERCRUISSE, L.; CALUWAERTS, S.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. Vercruysse, L., Caluwaerts, S., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2006). Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. **Placenta**, v.27, n.1, p. 22-33.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 13 mar. 2012.

VONNAHME, K. A.; EVONIUK, J.; JOHNSON, M. L.; BOROWICZ, P. P.; LUTHER, J. S.; PANT, D.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Placental vascularity and growth factor expression in singleton, twin, and triplet pregnancies in the sheep. **Endocrine**, v. 33, n. 1, p. 53–61, 8 abr. 2008.

WAKELAND, A. K.; SONCIN, F.; MORETTO-ZITA, M.; CHANG, C. W.; HORII, M.; PIZZO, D.; NELSON, K. K.; LAURENT, L. C.; PARAST, M. M. Hypoxia Directs Human Extravillous Trophoblast Differentiation in a Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Manner. **American Journal of Pathology**, v. 187, n. 4, p. 767–780, 1 abr. 2017.

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.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 326–335, 20 jan. 2016.

WANG, Y.; ZHAO, S. Vascular Biology of the Placenta. **Vascular Biology of the Placenta**, 2010.

WATANABE, K.; SHIBUYA, S.; OZAWA, Y.; NOJIRI, H.; IZUO, N.; YOKOTE, K.; SHIMIZU, T. Superoxide Dismutase 1 Loss Disturbs Intracellular Redox Signaling, Resulting in Global Age-Related Pathological Changes. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WEISS, A.; GOLDMAN, S.; SHALEV, E. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 2, p. 649–659, 2007.

WHITLEY, G. S. J.; CARTWRIGHT, J. E. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 21, 2009.

WONG, M. K.; NICHOLSON, C. J.; HOLLOWAY, A. C.; HARDY, D. B. Maternal Nicotine Exposure Leads to Impaired Disulfide Bond Formation and Augmented Endoplasmic Reticulum Stress in the Rat Placenta. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122295, 26 mar. 2015.

WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 570, 27 set. 2018.

XU, Y.; SUN, D.; SONG, C.; WANG, R.; DONG, X. MnTMPyP inhibits paraquat-induced pulmonary epithelial-like cell injury by inhibiting oxidative stress. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 43, n. 9, p. 545–555, 4 set. 2018.

YANG, Y.; HE, Y.; JIN, Y.; WU, G.; WU, Z. Amino Acids in Endoplasmic Reticulum Stress and Redox Signaling. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1332, p. 35–49, 2021.

YELAVARTHI, K. K.; CHEN, H. L.; YANG, Y. P.; COWLEY, B. D.; FISHBACK, J. L.; HUNT, J. S. Tumor necrosis factor- α mRNA and protein in rat uterine and placental cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 11, 1991.

YOSHIDA, K.; KUSAMA, K.; TAMURA, K.; FUKUSHIMA, Y.; OHMARU-NAKANISHI, T.; KATO, K. Alpha-1 Antitrypsin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Invasion by Extravillous Trophoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3683, 1 abr. 2021.

YUNG, H. W.; KOROLCHUK, S.; TOLKOVSKY, A. M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BURTON, G. J. 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, 1 mar. 2007.

YUNG, H. W.; CALABRESE, S.; HYNX, D.; HEMMINGS, B. A.; CETIN, I.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BURTON, G. J. Evidence of Placental Translation Inhibition and Endoplasmic Reticulum Stress in the Etiology of Human Intrauterine Growth Restriction. *The American Journal of Pathology*, v. 173, n. 2, p. 451–462, 1 ago. 2008.

YUNG, H. W. COX, M.; PATOT, M. T. VAN.; BURTON, G. J. Evidence of endoplasmic reticulum stress and protein synthesis inhibition in the placenta of non-native women at high altitude. *The FASEB Journal*, v. 26, n. 5, p. 1970, maio 2012.

YUNG, H. W.; ATKINSON, D.; CAMPION-SMITH, T.; OLOVSSON, M.; CHARNOCK-JONES, D. S.; BURTON, G. J. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *The Journal of Pathology*, v. 234, n. 2, p. 262–276, 1 out. 2014.

ZEJNULLAHU, V. A.; ZEJNULLAHU, V. A.; KOSUMI, E. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review. *Reproductive Health*, v. 18, n. 1, p. 1–12, 16 dez. 2021.

ZHANG, C.; HAO, X.; CHANG, J.; GENG, Z.; WANG, Z. Mn-TAT PTD-Ngb attenuates oxidative injury by an enhanced ROS scavenging ability and the regulation of redox signaling pathway. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 27 dez. 2019.

ZHANG, D.; Liu, H.; Zeng, J.; Miao, X.; Huang, W.; Chen, H.; Huang, Y.; Li, Y.; Ye, D. Glucocorticoid exposure in early placentation induces preeclampsia in rats via interfering trophoblast development. *General and Comparative Endocrinology*, v. 225, p. 61–70, 1 jan. 2016.

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, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0177>.

ZHANG, J.; WANG, X.; VIKASH, V.; YE, Q.; WU, D.; LIU, Y.; DONG, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. Oxidative. *Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.

ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 455–462, 1 jul. 2008.

ZHANG, Z.; HUANG, C.; WANG, P.; GAO, J.; LIU, X.; LI, Y.; YAN, S.; SHI, Y. HIF-1 α affects trophoblastic apoptosis involved in the onset of preeclampsia by regulating FOXO3a

under hypoxic conditions. **Molecular Medicine Reports**, v. 21, n. 6, p. 2484–2492, 1 jun. 2020.

ZHAO, L.; SHAO, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; HE, Y.; WANG, L.; KONG, B.; QU, X.. Human monocytes undergo functional re-programming during differentiation to dendritic cell mediated by human extravillous trophoblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 9 fev. 2016.

ZHAO, Y.; CARROLL, D. W.; YOU, Y.; CHAISWING, L.; WEN, R.; BATINIC-HABERLE, I.; BONDADA, S.; LIANG, Y.; CLAIR, D. K. ST. A novel redox regulator, MnTnBuOE-2-PyP5+, enhances normal hematopoietic stem/progenitor cell function. **Redox Biology**, v. 12, p. 129–138, 1 ago. 2017.

ZHOU, Q. Q.; GENSCHE, C.; KELLER, C.; SCHMITT, H.; ESSER, J.; MOSER, M.; LIAO, J. K. MnTBAP stimulates angiogenic functions in endothelial cells through mitofusin-1. **Vascular Pharmacology**, v. 72, p. 163–171, 23 maio 2015.

ZHOU, Y.; CHEN, Y.; CAO, X.; LIU, C.; XIE, Y. Association between plasma homocysteine status and hypothyroidism: a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 11, p. 4544, 30 nov. 2014.

ZHU, J.Y.; PANG, Z. J.; YU, Y. Regulation of Trophoblast Invasion: The Role of Matrix Metalloproteinases. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 5, n. 3–4, p. e137, 2012.

ZIEGELMÜLLER, B.; VATTAI, A.; KOST, B.; KUHN, C.; HOFMANN, S.; BAYER, B.; TOTH, B.; JESCHKE, U.; DITSCH, N. Expression of Thyroid Hormone Receptors in Villous Trophoblasts and Decidual Tissue at Protein and mRNA Levels Is Downregulated in Spontaneous and Recurrent Miscarriages. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 63, n. 7, p. 511–523, 3 jul. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Imuno-histoquímica (IHC)

1º DIA

- Xileno I(60min);
- Xileno II (60min);
- Álcool Absoluto I(5min);
- Álcool Absoluto II(5min);
- Álcool Absoluto III(5min);
- Álcool 90% (5min);
- Álcool 80% (5min);
- Álcool 70% (5min);
- Água corrente (5min);
- Banho-mariaa98°C(tampão citrato pH 6,0)(20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente);

Obs: preparo do tampão Citrato: 1,05 g de ácido cítrico + 500 mL de H₂O (água destilada)

Obs.: ajustar o pH para 6,0.

- PBS (5min);
- PBS (5min);
- PBS (5min);

Obs: preparo do PBS: 1 L de H₂O(destilada) + 7,2 g de NaCL + 0,43 g de fosfato de sódio monobásico + 1,48g de fosfato de sódio dibásico; ajustar o pH para 7,2.

- Bloqueio da peroxidase (30min - no escuro);

Obs: preparo do bloqueio peroxidase: 6 mLdeH₂O₂+194mLdemetanol; Obs.: o preparo da solução deve ser no momento do uso

- PBS (5min);
- PBS (5min);
- Soro bloqueio (30min)–câmara úmida à temperatura ambiente;
- Anticorpo primário (*overnight*) – câmara úmida na geladeira;

2º DIA

- PBS (5min);

- PBS (5min);
- PBS (5min);
- Anticorpo secundário (45min) – câmara úmida à temperatura ambiente;
- PBS (5min);
- PBS (5min);
- PBS (5min);
- Estreptovidina-peroxidase (30min)-(câmara úmida à temperatura ambiente);
- PBS (5min);
- PBS (5min);
- PBS (5min);
- **DAB; Obs: Diluição do DAB:** 500µL de diluente para 25 µL de DAB (1:20). Obs.:O tempo do DAB varia de acordo como anticorpo.
- Água corrente (10min);
- Hematoxilina (60seg);
- Água corrente (10min);
- Álcool 70% (3min);
- Álcool 80% (3min);
- Álcool 90% (3min);
- Álcool Absoluto I (15min);
- Álcool Absoluto II (15min);
- Álcool Absoluto III (15min);
- Xileno I (10min);
- Xileno I (10min);
- Montagem da lâmina.

APÊNDICE B: Extração de RNA com Trizol

- Homogeneizar o fragmento de tecido em eppendorfe de 1,5 ml com 500 µL de Trizol como uso de um homogeinizador;
- Adicionar mais 500 µL de Trizol no eppendorfe e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Adicionar 200 µL de clorofórmio/eppendorfe, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos no gelo;
- Centrifugar por 15 minutos a 12000 g (4°C);
- Transferir a fase aquosa para outro eppendorfe;
- Adicionar 500 µL de isopropanol e incubar por 30 minutos a -80°C;
- Descongelar no gelo e centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C);
- Retirar o sobrenadante e colocar em outro eppendorfe. Acondicionar o pellet no gelo e centrifugar o sobrenadante por 10min a 12000 g (4°C);
- Descartar o sobrenadante e lavar os pellets com 1 ml de etanol 75%;
- Centrifugar por 5 minutos a 10500 g (4°C);
- Secar o pellet por 5 minutos;
- Dissolver o pellet em água DEPC (20µl);
- Colocar todos os tubos no termobloco a 56°C durante 10 minutos (para solubilizar o RNA);
- Dosar o RNA em Nanodrop. Obs.: Estocar o RNA a -80°C.

APÊNDICE C: SÍNTESE DO cDNA:

Obs: o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)

- Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em nanodrop e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.
- Caso necessário fazer a diluição do RNA.
- Passo 1 : Mix 1: Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase free. Vai conter o Randow, DNTP, RNA diluído e H₂O, deve ser feito o cálculo antes da proporção desses itens. Pipetar em tubos 0,2 microlitros p/ cDNA. Fazer um spin nos tubos e colocá-los no Termociclador programado por 5 minutos no a 65°C.

Cálculos: para 20 microlitros:

Randow-1µl;

DNTP-1µl;

RNA- 5 µl (Fazer o cálculo);

H₂O-6µl.

- Passo 2: o Mix 2 vai conter o Buffer5x, DTT, RNase inibidor e superscript., deve ser feito o cálculo antes da proporção desses itens. Adicionar ao mix 1, fazer um spin nos tubos e colocá-los no Termociclador programado para:25°C por 10 minutos; 50°C por 10 minutos; 80°C por 10 minutos.

Cálculos: para 20 microlitros:

Buffer 5x- 4 µl;

DTT- 1 µl;

Inibidor- 1 µl;

Superscript- 1 µl.

- Colocar no gelo as amostras e adicionar RNase H por tubo, ver cálculos antes. Colocá-los no Termociclador novamente programado a 37°C por 20 minutos
- Estocar o cDNA a -20°C.

APÊNDICE D: qPCR TEMPO REAL

Obs: Kit utilizado: PowerUp™ SYBR™ Green (Master Mix Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green, Thermo Fisher scientific).

Aparelho utilizado: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies).

- Recomendação do kit: volume final de reação de 20 µL, porém faz-se 15 µL de volume final, ou seja, 1,5 µL de cDNA para 15 µL de reação.
- Preparar o Mix:

SYBR PowerUP- 7,5 µL;

Primer forward-1,2 µL

Primer reverse 1,2 µL

cDNA- 1 µL -----

H₂O- 4,1 µL

- Preparar o MIX em tubos DNase e RNase free. Pipetar 14 µL de MIX em cada poço e acrescentar 1µl de cDNA (um por amostra) ou 1 µl de água DEPC (controle negativo).
- Preparar um MIX para cada primer, sendo que se coloca primeiro a H₂O, segundo o SYBR PowerUP; depois os primers forward e reverse.
- Após preparar a placa de PCR contendo MIX + cDNA é importante dar um spin na placa antes de colocá-la na máquina de PCR tempo real.
- Programação da máquina de RT-PCR (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System) nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 3 s, e anelamento/extensão a 60 °C por 30 s.

OBS: a reação com 15 µl não gera curva de Melt, só com 20 µl.

APÊNDICE E: Processamento histológico – Inclusão em parafina

- Álcool 70% (pelo menos 2 horas)
- Álcool 80% (2 horas);
- Álcool 90% (2 horas);
- Álcool Absoluto I (2 horas);
- Álcool Absoluto II (2 horas);
- Xileno (20 minutos);
- Banho de parafina (30 minutos);
- Emblocamento.

APÊNDICE F: Coloração por Hematoxilina e Eosina

- Xileno I (20min);
- Xileno II (20min);
- Álcool Absoluto I (5min);
- Álcool Absoluto II (5min);
- Álcool Absoluto III (5min);
- Álcool 90% (5min);
- Álcool 80% (5min);
- Álcool 70% (5min);
- Água destilada (3min);
- Hematoxilina (40seg);
- Água corrente (10min);
- Eosina (20seg);
- Água corrente (1 min);
- Álcool 90% (5min);
- Álcool Absoluto I (10min);
- Álcool Absoluto II (10min);
- Álcool Absoluto III(10min);
- Xileno I (10min);
- Xileno II(10min)
- Montagem da lâmina.

APÊNDICE G: Avaliação da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), glutathione transferase (GST) e catalase

- **Preparo das amostras**

As amostras das placentas armazenadas a -80°C foram descongeladas e homogeneizadas no sonicador (Cole-Parmer Ultrasonic Processador®) com tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM (pH 7,0) sob amplitude de 70%, pulsos de 5 segundos (ON) e intervalos de 10 segundos (OFF), totalizando 40 segundos, as amostras sempre mantidas no gelo. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm sob refrigeração a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, transferidos para novos microtubos e congelados a -80°C para avaliação da atividade das enzimas SOD, GST e Catalase.

- **Quantificação da proteína pelo método de Bradford**

A concentração de proteínas totais do homogenato foi avaliada pelo método descrito por Bradford (1976). A dosagem foi realizada em triplicata em placas de 96 poços. As amostras foram diluídas em TFK 50mM (pH 7,0) em uma proporção de 1:20. Para a quantificação, um total de 50 μL de cada amostra diluída e 200 μL do reagente de Bradford (Coomassie Blue G250 (Sigma B-0770)) foram utilizados, com incubação por 10 minutos, com posterior leitura da absorbância no comprimento de onda de 595nm. O cálculo da concentração foi baseado na curva padrão da solução de albumina de soro bovino (BSA) a 0,1mg/mL.

- **Quantificação da atividade de superóxido dismutase (SOD).**

A atividade de SOD foi avaliada de acordo com Marklund e Marklund (1974). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 1200 μL de TFK 50mM (pH 7,0) e 32 μL de EDTA. Depois, iniciou-se a reação adicionando 154 μL de pirogalol. Foi medida a oxidação do pirogalol durante 5 minutos a cada 30 segundos em um comprimento de onda de 420nm. Após os 5 minutos, foram adicionados 154 μL da amostra e continuou-se com a leitura por mais 5 minutos, totalizando 10 minutos de análise. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína.

- **Quantificação da atividade de glutathione transferase (GST)**

A atividade da GST foi realizada de acordo com Habig et al., (1974). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 200 μL de TFK 50 mM (pH 7,0), 290 μL de água destilada, 5 μL de GSH (1mM) e 5 μL de 1 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB), com posterior leitura do branco.

Para a leitura da amostra, foi colocada na cubeta 550µL de água destilada, 400µL de TFK 50 nM (pH 7,0), 5µL de GSH, 5µL de CDNB (1mM) e 25µL da amostra homogeneizada. A avaliação foi realizada a cada 30 segundos por 2 minutos no comprimento de onda de 340nm. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína.

- **Quantificação da atividade de catalase**

A avaliação da atividade da catalase foi realizada conforme Aebi (1984). Em uma cubeta de quartzo foram colocados 1800µL de TFK 50 nM (pH 7,0) calibrando o branco e adicionando 120µL de peróxido de hidrogênio(H₂O₂) 30 mM e foi realizada a leitura até 45 segundos. Logo após, foram colocados 9 µL de cada amostra homogeneizada e a leitura foi realizada a cada 15 segundos, durante 150 segundos, no comprimento de onda de 240nm no espectrofotômetro. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína.

APÊNDICE H: TABELA COM OS ANTICORPOS USADOS NA IMUNOHISTOQUIMICA

Anticorpo	Espécie/clone	Diluição	Tempo de revelação no DAB
Anti-HIF1α	Mouse/monoclonal	1:1000	4 minutos
Anti-8-OHdG	Mouse/monoclonal	1:200	10 minutos
Anti-SOD	Mouse/ monoclonal	1:1000	15 segundos
Anti- GPX1/2	Mouse/ monoclonal	1:1000	40 segundos
Anti- catalase	Mouse/ monoclonal	1:1000	1 minuto
ANTI-ATF4	Mouse/ monoclonal	1:1000	4 minutos
Anti- GRP78	Mouse/ monoclonal	1:1000	4 minutos
Anti-CHOP	Mouse/monoclonal	1:1000	14 minutos
Anti-VEGF	Coelho/policlonal	1:200	12 minutos
Anti-TNFα	Mouse/monoclonal	1:500	3 minutos
Anti-IL10	Mouse/monoclonal	1:6000	30 minutos