



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

THAYNÁ QUEIROZ MENEZES DA SILVA

**MODULAÇÃO DO SISTEMA KISSPEPTINA/KISS1R E DE
MEDIADORES DA RECEPTIVIDADE UTERINA E DA
FUNÇÃO TUBÁRIA EM RATAS HIPOTIREOIDEAS AO
LONGO DO CICLO ESTRAL**

ILHÉUS- BAHIA

2024

THAYNÁ QUEIROZ MENEZES DA SILVA

**MODULAÇÃO DO SISTEMA KISSPEPTINA/KISS1R E DE
MEDIADORES DA RECEPTIVIDADE UTERINA E DA
FUNÇÃO TUBÁRIA EM RATAS HIPOTIREOIDEAS AO
LONGO DO CICLO ESTRAL**

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

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e
Experimentação Animal

Sub-área: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

ILHÉUS-BAHIA

2024

THAYNÁ QUEIROZ MENEZES DA SILVA

**MODULAÇÃO DO SISTEMA KISSPEPTINA/KISS1R E DE MEDIADORES DA
RECEPTIVIDADE UTERINA E DA FUNÇÃO TUBÁRIA EM RATAS
HIPOTIREOIDEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL**

ILHÉUS – BAHIA, 28/02/2024

Juneo Freitas Silva - DSc

UESC/DCB (Orientador)

Raphael Escorsim Szawka - DSc

UFMG/DFIB

Nayara Soares Sena Aquino - DSc

USP/ EACH

ILHÉUS – BAHIA

2024

Dedico a minha família, que me acompanhou durante esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

João 16:33 diz que “Eu disse essas coisas para que em mim vocês tenham paz. Neste mundo vocês terão aflições; contudo tenham ânimo! Eu venci o mundo.” Se finda mais uma etapa de minha vida e nesse caminho Deus esteve presente em cada instante, agradeço primeiramente a Ele pelo sustento nos momentos difíceis e por ter sido o alicerce para continuar a minha caminhada acadêmica.

Agradeço a minha família, em particular meu esposo Iago Vitor, por auxiliar em tantas etapas desta caminhada, tanto emocionalmente como também em companhia na vida e na pesquisa. Aos meus pais Ezequias e Silene pelo incentivo, palavras de ânimo, conselhos e sacrifícios para possibilitar o meu estudo. Minha irmã, Ana lis, obrigada pelos conselhos e por me ajudar a enxergar saídas quando eu não consigo; você foi essencial nesta conquista. À minha avó, por todo carinho e amor, obrigada por tanto. Às minhas irmãs Natália, Narjara, e à minha sobrinha, Helena, agradeço por todo carinho e risadas compartilhadas. A todos os tios, primos e Pituka, meu agradecimento pelo carinho dispensado. Agradeço por acreditarem em mim e por terem sonhado meus sonhos. A vocês, dedico mais esta etapa concluída.

Ao meu professor Juneo Freitas, por ser um exemplo na carreira e um excelente orientador, que esteve sempre disponível para sanar as dúvidas e corroborando para a minha melhora como pesquisadora e profissional. Ao NuRE, a cada colega da pós e aos alunos de iniciação científica que tanto me auxiliaram nas atividades. Em especial, Luciana, Erikles, Luciano, Maria Clara, Jeane, Brenda e Natália, agradeço por todo apoio, ajuda nos experimentos, conversas e resenhas que nos mantém sãos e firmes na pesquisa.

Expresso minha gratidão também a equipe do CME, em especial à Tia Jacy que sempre nos recebe com tanto carinho e amor, nos salva com seu cafezinho, e é a alma do CME. Aos funcionários dos laboratórios da UESC que auxiliaram para que tudo isto fosse possível, meus sinceros agradecimentos. Aos tantos amigos e amigas que foram imprescindíveis nesta caminhada, sempre me auxiliando e sendo, por diversas vezes, a “válvula de escape” nos momentos mais difíceis, destaco especialmente Luana, Clara, Lais, Maely, Manuela, Camila e Lorena. A UESC, ao Programa de Pós graduação em Ciência Animal e todos os professores, agradeço por todo suporte, apoio e infraestrutura. À CAPES, agradeço pela bolsa concedida. A todos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional que me fizeram chegar até aqui, serei eternamente grata.

“Alegrem-se na esperança, sejam pacientes na tribulação, perseverem na oração”

Romanos 12:12

MODULAÇÃO DO SISTEMA KISSPEPTINA/KISS1R E DE MEDIADORES DA RECEPTIVIDADE UTERINA E DA FUNÇÃO TUBÁRIA EM RATAS HIPOTIREOIDEAS AO LONGO DO CICLO ESTRAL

RESUMO

O hipotireoidismo causa disfunção ovariana e infertilidade em mulheres e animais e compromete a expressão hipotalâmica de kisspeptina (Kp), neuropeptídeo que controla a reprodução. No entanto, a kisspeptina também é expressa no sistema genital, sendo que falhas na expressão ovariana e uterina do seu receptor estão associadas a falha ovariana prematura e redução da implantação. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do hipotireoidismo na expressão de kisspeptina e seu receptor Kiss1r no útero e tuba uterina de ratas ao longo do ciclo estral e sua relação com a sinalização estrogênica e progesterônica e expressão de mediadores da receptividade uterina e da função tubária. Para isso, o hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil (PTU) em Ratas Wistar cíclicas. Os animais foram divididos nos grupos controle (n=21) e hipotireoideo (n=21) e após 14 dias de indução do hipotireoidismo as eutanásias foram realizadas nas fases de proestro, estro e diestro (7 animais/grupo). No **Capítulo 1**, foram avaliados os níveis plasmáticos de LH, E₂ e P₄, a ciclicidade, o peso corporal e uterino, a histomorfometria do útero, como também a sua expressão gênica e proteica de Kiss1, Kiss1r, ER α e PR, além da atividade proliferativa (CDC-47) e expressão gênica de mediadores da receptividade uterina (*Smo*, *Wnt4*, *Bmp2*, *Hand2*, *Muc1* e *Lif*). O hipotireoidismo em ratas aumentou os dias em diestro, além de aumentar os níveis plasmáticos de P₄ no diestro e reduzir LH e E₂ na tarde do proestro. No útero, reduziu o número de glândulas endometriais no proestro e estro, a atividade proliferativa endometrial e a expressão gênica e proteica de ER α . Por outro lado, a hipofunção tireoidiana aumentou a imunomarcagem endometrial de PR em todas as fases do ciclo, enquanto reduziu a expressão gênica de *Pr* no diestro. No diestro, também houve redução da expressão gênica uterina de *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2* e da imunomarcagem de Kiss1 nas ratas hipotireoideas, enquanto uma redução do mRNA de *Kiss1r* foi observada no proestro. No **Capítulo 2**, foram avaliados a expressão gênica e proteica de Kiss1, Kiss1r, ER α e PR na tuba uterina, além da expressão gênica de mediadores da função tubária (*Amigo2*, *Fetub*, *Aqua5*, *Rasd1* e *Endotelin*). O hipotireoidismo em ratas reduziu a imunomarcagem epitelial citoplasmática de ER α na tuba uterina no proestro, enquanto aumentou a expressão gênica de *Pr*, *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1*, *Fetub* e *Kiss1r* na mesma fase do ciclo. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstraram que o hipotireoidismo desregula a sinalização estrogênica e progesterônica no útero e tuba uterina de ratas ao longo do ciclo estral, sendo que essas alterações estão associadas a alterações na expressão do sistema Kiss1/Kiss1r e de mediadores da receptividade uterina e da função tubária.

Palavras-chave: Ciclo estral; kisspeptina; receptores hormonais; reprodução; tireoide.

MODULATION OF THE KISSPEPTIN/KISS1R SYSTEM AND MEDIATORS OF UTERINE RECEPTIVITY AND TUBAL FUNCTION IN HYPOTHYROID RAT THROUGHOUT THE ESTRAL CYCLE

ABSTRACT

Hypothyroidism causes ovarian dysfunction and infertility in women and animals and compromises the hypothalamic expression of kisspeptin (Kp), a neuropeptide that controls reproduction. However, kisspeptin is also expressed in the genital system, and failures in ovarian and uterine expression of its receptor are associated with premature ovarian failure and reduced implantation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of hypothyroidism on the expression of kisspeptin and its receptor *Kiss1r* in the uterus and fallopian tube of rats throughout the estrous cycle and its relationship with estrogenic and progesterone signaling and expression of mediators of uterine receptivity and of tubal function. For this, hypothyroidism was induced by daily administration of propylthiouracil (PTU) in cyclic Wistar rats. The animals were divided into control (n=21) and hypothyroid (n=21) groups and after 14 days of hypothyroidism induction, euthanasias were performed in the proestrus, estrus and diestrus phases (7 animals/group). In **Chapter 1**, plasma levels of LH, E₂ and P₄, cyclicity, body and uterine weight, and uterine histomorphometry were evaluated, as well as gene and protein expression of *Kiss1*, *Kiss1r*, ER α and PR, in addition to the proliferative activity (CDC-47) and gene expression of mediators of uterine receptivity (*Smo*, *Wnt4*, *Bmp2*, *Hand2*, *Muc1* and *Lif*). Hypothyroidism in rats increased the days in diestrus, in addition to increasing plasma levels of P₄ in diestrus and reducing LH and E₂ in the afternoon of proestrus. In utero, it reduced the number of endometrial glands in proestrus and estrus, endometrial proliferative activity and gene and protein expression of ER α . On the other hand, thyroid hypofunction increased endometrial PR immunostaining at all phases of the cycle, while reduced *Pr* gene expression in diestrus. In diestrus, there was also a reduction in uterine gene expression of *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2* and *Kiss1* immunostaining in hypothyroid rats, while a reduction in *Kiss1r* mRNA was observed in proestrus. In **Chapter 2**, the gene and protein expression of *Kiss1*, *Kiss1r*, ER α and PR in the fallopian tube were evaluated, in addition to the gene expression of tubal function mediators (*Amigo2*, *Fetub*, *Aqua5*, *Rasdl* and *Endothelin*). Hypothyroidism in rats reduced cytoplasmic epithelial immunostaining of ER α in the fallopian tube in proestrus, while increased gene expression of *Pr*, *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasdl*, *Fetub* and *Kiss1r* in the same phase of the cycle. Taken together, the results of this study demonstrated that hypothyroidism deregulates estrogenic and progesterone signaling in the uterus and fallopian tube of rats throughout the estrous cycle, and these changes are associated with changes in the expression of the *Kiss1/Kiss1r* system and mediators of receptivity uterine and tubal function.

Keywords: Estrous cycle; hormonal receptors; kisspeptin; reproduction; thyroid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confirmação do hipotireoidismo e avaliação do peso corporal, ciclicidade e hormônios reprodutivos de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Dosagem plasmática de T4 livre; B) Peso corporal; C) Quantificação das fases do ciclo estral; D) Concentração plasmática de LH; E) Concentração plasmática de Estradiol (E₂); F) Concentração plasmática de Progesterona (P₄). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.....38

Figura 2. Morfologia uterina e atividade proliferativa endometrial de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Peso uterino; B) Espessura do endométrio; C) Número de glândulas endometriais. D) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de CDC47 no útero (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm); E) Área de imunomarcção em pixels da expressão de CDC47 no útero. F-H) Porcentagem de células imunomarcadas para CDC47 no proestro (F), estro (G) e diestro (H). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05, **P < 0,01. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais.....39

Figura 3. Expressão de ERα no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ERα (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B-D) Porcentagem de células imunomarcadas para ERα no epitélio luminal e glandular e estroma nas fases de proestro (B), estro (C) e diestro (D). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão endometrial de ERα. F) Expressão gênica relativa do *Era*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais.....41

Figura 4. Expressão de PR no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de PR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B-D) Porcentagem de células imunomarcadas para PR no epitélio luminal e glandular e estroma nas fases de proestro (B), estro (C) e diestro (D). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão endometrial de PR. F) Expressão gênica

relativa do *Pgr*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais.....42

Figura 5. Expressão gênica de *Muc1*, *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2*, *Smo* no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Expressão gênica relativa de *Muc1* no útero. B) Expressão gênica relativa de *Lif* no útero. C) Expressão gênica relativa de *Bmp2* no útero. D) Expressão gênica relativa de *Wnt4* no útero. E) Expressão gênica relativa de *Hand2* no útero. F) Expressão gênica relativa de *Smo* no útero. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *p < 0,05 **p < 0,01, ***p < 0,001.....43

Figura 6. Expressão gênica de *Kiss1* e *Kiss1R* no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A-B) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* (A) e *Kiss1R* (B) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). C e E) Área de imunomarcção em pixels da expressão endometrial de *Kiss1* (C) e *Kiss1R* (E). D e F) Expressão gênica relativa do *Kiss1* (D) e *Kiss1r* (F). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01, ***P < 0,001.....44

Figura 7. Expressão de ERα e PR na tuba uterina de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ERα (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B) Porcentagem de células marcadas para ERα no epitélio do infundíbulo/ampola da tuba uterina. C) Expressão gênica relativa do *Era*. D) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de PR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). E) Porcentagem de células marcadas para PR no epitélio do infundíbulo/ampola da tuba uterina. F) Expressão gênica relativa do *Pgr*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01.....56

Figura 8. Expressão gênica de *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasdl* e *Fetub* na tuba uterina de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Expressão gênica relativa de *Et-1*; B) Expressão gênica relativa de *Amigo2*; C) Expressão gênica relativa de *Aqp5*; D) Expressão gênica relativa de *Rasdl*; E) Expressão gênica relativa de *Fetub*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05; **P < 0,01; ****P < 0,0001.....57

Figura 9. Expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* na tuba uterina de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). B) Expressão gênica relativa de *Kiss1*; C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 µm). D) Expressão gênica relativa de *Kiss1r*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real no útero.....	36
Tabela 2 - Lista de genes e iniciadores para qPCR em tempo real na tuba uterina.....	54
Tabela 3 - Concentração plasmática de tiroxina (T ₄) livre, esteroides sexuais e hormônio luteinizante (LH) nos grupos controle e hipotireoideo nas fases do ciclo estral.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AMIGO2 - Molécula de adesão com domínio semelhante a IgG 2

AQP - Aquaporinas

ARC- Núcleo arqueado

AVPV - Área periventricular anteroventral

BMP – Proteína Morfogenética Óssea

CE – Células estromais

COX-2 - Cicloxigenase 2

DAB – Diaminobenzidina

DNase – Desoxirribonuclease

E₂ – Estradiol

EG – Epitélio glandular

EL – Epitélio Luminal

ER α – Receptor de estrógeno alfa

Esr1 – Gene codificante do receptor de estrógeno

Et-1 – Gene codificante endotelina 1

Fetub – Gene codificante da Fetuina-b

FGF - Fator de crescimento fibroblástico

FSH - Hormônio folículo estimulante

FST - Folistatina

GnRH – Hormônio liberador de gonadotropina

GPR54 – Receptor 54 acoplado a proteína Gq

HPG - Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal

HT – Hormônio tireoidiano

Hand2- Gene codificante de Derivados do coração e da crista neural expressos 2

Ihh – Gene codificante do ouriço indiano

Kiss1 - Gene codificante de Kisspeptina

Kiss1r - Gene codificante do receptor de Kisspetina

KNDy – Neurônios produtores de kisspeptina, neurocinina B e dinorfina

Kp - Kisspeptina

Kp10 - Kisspeptina 10

Kp54 - Kisspeptina 54

LH - Hormônio luteinizante

LIF – Fator Inibidor de Leucemia

MUC 1- Mucina 1

PR- Receptor de progesterona

P₄ – Progesterona

PGF₂α – Prostaglandina F2 alfa

PGE₂ – Prostaglandina E2

PTU – 6-propyl-2-thiouracil

P234- Peptídeo 234 antagonista de kisspeptina

RNAse – Ribonuclease

Rasd1- Gene codificante da proteína 1 relacionada à Ras

StAR - Proteína reguladora aguda esteroideogênica

Smo – Gene codificante do receptor de *Ihh*

TGFβ - Fator de crescimento transformador beta

WNT4- Site de integração relacionado ao Wingless 4

3βHSD – Enzima 3 beta-hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Fisiologia reprodutiva da rata	18
3.2 Ciclo estral	18
3.2 Hormônios sexuais	19
3.3 Útero	21
3.4 Tuba uterina	22
3.5 Moduladores da função uterina e tubária	24
3.6 Efeitos do hipotireoidismo no sistema reprodutivo da fêmea	26
3.7 Kisspeptina e seu receptor Kiss1r	28
4 CAPÍTULO I: Hipotireoidismo afeta a expressão de Kisspeptina/Kiss1r e de moduladores da receptiva uterina em ratas hipotireoideas ao longo do ciclo estral	31
4.1 Introdução	31
4.2 Material e Métodos	33
4.2.1 Manejo animal e indução do hipotireoidismo.....	33
4.2.2 Eutanásia e coleta de material.....	33
4.2.3 Análise hormonal.....	33
4.2.4 Análise histomorfométrica.....	34
4.2.5 Imuno-histoquímica.....	34
4.2.6 qPCR em tempo real	35
4.2.7 Análise estatística.....	36
4.3 Resultados	37
4.3.1 O hipotireoidismo altera a ciclicidade e o perfil plasmático de LH e dos hormônios sexuais de ratas ao longo do ciclo estral.....	37
4.3.2 O hipotireoidismo altera a atividade proliferativa uterina de ratas ao longo do ciclo estral.....	38
4.3.3 O hipotireoidismo altera a expressão uterina de ER α e PR em ratas ao longo do ciclo estral.....	39
4.3.4 O hipotireoidismo reduz a expressão gênica uterina <i>de Lif, Smo, Bmp2 e Wnt4</i> em ratas ao longo do ciclo estral.....	43

4.3.5 O hipotireoidismo reduz a expressão uterina de <i>Kiss1</i> e <i>Kiss1r</i> em ratas durante o ciclo estral.....	43
4.4 Discussão.....	45
4.5 Conclusão.....	48
5 CAPÍTULO II: A expressão de receptores de hormônios sexuais, genes responsivos à E₂ e P₄ e <i>Kiss1r</i> é alterado em tuba uterina de ratas hipotireoideas no proestro.....	49
5.1 Introdução.....	49
5.2 Material e métodos.....	51
5.2.1 Manejo animal e indução do hipotireoidismo.....	51
5.2.2 Eutanásia e coleta de material.....	51
5.2.3 Análise hormonal.....	52
5.2.4 Imuno-histoquímica.....	52
5.2.5 qPCR tempo real.....	53
5.2.6 Análise estatística.....	54
5.3 Resultados.....	54
5.3.1 O hipotireoidismo altera o perfil plasmático de LH, E ₂ e P ₄ em ratas ao longo do ciclo estral.....	54
5.3.2 O hipotireoidismo reduz a expressão citoplasmática de ER α na tuba uterina de ratas em proestro e aumenta a expressão gênica de <i>Pgr</i>	55
5.3.3 O hipotireoidismo aumenta a expressão gênica de <i>Et-1</i> , <i>Amigo2</i> , <i>Aqp5</i> , <i>Rasdl</i> e <i>Fetub</i> na tuba uterina de ratas em proestro.....	56
5.3.4 O hipotireoidismo não altera a expressão gênica de <i>Kiss1r</i> na tuba uterina de ratas ao longo do ciclo estral.....	57
5.4 Discussão.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HTs) influenciam o desenvolvimento intrauterino e pós-natal do sistema genital, inclusive seu metabolismo e função após a puberdade, exercendo papel essencial para a atividade reprodutiva normal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). A deficiência de HTs pode ser adquirida em qualquer fase da vida e é considerada uma das principais endocrinopatias que afetam humanos e animais (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018).

O hipotireoidismo causa hiperprolactinemia (HAPON *et al.*, 2003; TOHEI *et al.*, 2000) e ambas patologias reduzem a secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH) por comprometer a expressão hipotalâmica de kisspeptina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a; TOMORI *et al.*, 2017). A kisspeptina é um peptídeo que regula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), sendo considerada o regulador chave do eixo reprodutivo (CAO *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2018; MESSENGER *et al.*, 2005). No entanto, a kisspeptina também é expressa periféricamente, particularmente no sistema genital feminino (SCHAFFER *et al.*, 2021). E apesar da expressão periférica de kisspeptina não ser vital para a reprodução (KIRILOV *et al.*, 2013), pesquisas demonstram uma importante ação estimulatória em várias funções dos tecidos periféricos. Estudos em ratas já demonstraram que o LH estimula a expressão de kisspeptina em células da granulosa na fase do proestro (LAOHARATCHATHANIN *et al.*, 2015a), enquanto kisspeptina induz relaxamento miometrial em ratas gestantes e não gestantes (SCHAFFER *et al.*, 2021). Schaefer *et al.* (2021) também demonstraram em camundongos que Kiss1R regula negativamente a expressão e sinalização uterina do receptor de estrógeno α (ER α) no período da implantação, enquanto a deleção de *Kiss1r* no ovário causa falha ovariana prematura (RUOHONEN *et al.*, 2022). Assim, esses dados sugerem que falhas na expressão periférica de kisspeptina também pode estar associada a infertilidade (CALDER *et al.*, 2014a; FERNANDOIS *et al.*, 2016).

Ratas com hipotireoidismo apresentam redução da espessura do endométrio e das glândulas endometriais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a), além de redução da área de decídua (SOUZA *et al.*, 2017), sendo que em mulheres hipotireoideas a menor decidualização foi associada a redução de moléculas de sinalização uterina como gene codificante de Derivados do coração e da crista neural expressos 2 (HAND2), prolactina (PRL) e proteína 1 de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBP-1) (KAKITA-KOBAYASHI *et al.*, 2020). Estudos com camundongos também demonstraram que redução da sinalização de

kisspeptina em cultura de células estromais uterinas compromete a decidualização (ZHANG *et al.*, 2014), enquanto no útero de camundongos e gatas há aumento da expressão de kisspeptina no diestro gestacional e não-gestacional (FAYAZI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2021), particularmente no período de implantação embrionária (FAYAZI *et al.*, 2015). Falha na implantação embrionária em ratas com hipotireoidismo também está associada a redução da sinalização endometrial do fator inibidor de leucemia (LIF)(SHAN *et al.*, 2019), como também observado em camundongos nocautes para *Kiss1* (CALDER *et al.*, 2014a). No entanto, ainda não há informações se o hipotireoidismo afeta a expressão uterina de kisspeptina ao longo do ciclo estral e sua relação com a expressão de moduladores da receptividade uterina.

Contudo, ratas hipotireoideas em diestro também apresentam redução das vilosidades da tuba uterina (OLIVEIRA *et al.*, 2005), como também foi observado por (ANAYA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015) em coelhas hipotireoideas, além de alterações no conteúdo do fluido tubário (MÉNDEZ-TEPEPA *et al.*, 2020). MITTAG *et al.* (2007) também descreveu a ocorrência de hidrosalpinge em ratas hipotireoideas, embora os mecanismos dessas alterações na secreção tubária sejam desconhecidos. Vale ressaltar que essas alterações na morfologia e secreção tubária podem comprometer a fertilização e nutrição embrionária, podendo estar relacionada a infertilidade observada em quadros de hipotireoidismo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a). Vale ressaltar que a tuba uterina também expressa kisspeptina (GAYTÁN *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2014), principalmente no proestro/estro, sugerindo a sua participação no processo de fertilização (HSU *et al.*, 2014), embora não tenha informações sobre a sua expressão na hipofunção tireoidiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a modulação do sistema kisspeptina/Kiss1r e de mediadores da receptividade uterina e função tubária em ratas hipotireoideas ao longo do ciclo estral.

2.2 Específicos

Avaliar em ratas hipotireoideas ao longo do ciclo estral:

- A ciclicidade e os níveis plasmáticos de LH, E₂ e P₄;
- O perfil de expressão proteica e gênica de kisspeptina/Kiss1r no útero e tuba uterina;
- A expressão de receptores de estrógeno e progesterona (ER α e PR) no útero e tuba uterina;
- A histomorfometria e proliferação celular uterina (CDC-47/MCM2);
- A expressão endometrial de *Muc1*, *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2* e *Smo*.
- A expressão tubária de *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1* e *Fetub*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiologia reprodutiva da rata

Os roedores são os animais de experimentação mais utilizados para pesquisas científicas, sendo que os de maior destaque para o uso científico são os ratos e camundongos (GOMES DE MACEDO BRAGA, 2017). Isto se justifica pela facilidade de manejo e adaptação destes pequenos mamíferos, a rápida reprodução, além das similaridades com a fisiologia reprodutiva das mulheres (AJAYI; AKHIGBE, 2020; GORSKA, 2000; MARKEE, 1951). As ratas atingem sua maturidade sexual com cerca de dois meses de idade, próximo de quando ocorre a abertura vaginal. São animais poliéstricos, ou seja, ovulam várias vezes no ano, sendo essas ovulações espontâneas, independente da presença do macho ou outro estímulo. As ratas possuem ciclos estrais regulares e de curta duração e a sua gestação dura em média 21 dias, produzindo cerca de 6-12 filhotes em cada ninhada (MARKEE, 1951; SONE *et al.*, 2007).

3.2 Ciclo estral

O ciclo reprodutivo ou estral da rata tem duração média de 4-5 dias, sendo dividido em quatro fases distintas e contínuas: o proestro, fase que compreende o período pré-ovulatório; estro, período de receptividade da fêmea; diestro 1 (metaestro), período no qual ocorre a redução da atividade uterina; e diestro 2, fase que ocorre o pico e redução da progesterona. Caso ocorra a concepção, a fase de diestro se prolonga até o fim da gestação (21 dias) (CALIGIONI, 2010; CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; EKAMBARAM; KUMAR; JOSEPH, 2017; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975).

As alterações hormonais dos esteroides sexuais (estradiol e progesterona) que ocorrem fisiologicamente ao longo do ciclo estral refletem em alterações citológicas no canal vaginal, formando padrões celulares distintos a depender da fase estral e estas podem ser observadas a partir de esfregaços vaginais (CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; JOHNSON, 2018). O proestro, que possui duração média de 12 a 14 horas, apresenta na citologia predominância de células epiteliais nucleadas, redondas, que podem estar agrupadas ou individuais, além de poder ser visto células epiteliais escamosas cornificadas. Esta fase corresponde a fase folicular de mulheres, pois apresenta pico de estradiol devido o desenvolvimento folicular, enquanto a progesterona tem seus níveis aumentados, devido ao corpo lúteo recém formado (FREEMAN, 1994).

No estro, com duração de 25 a 27 horas, é observado basicamente o predomínio de células epiteliais anucleadas ou queratinizadas, também chamadas de células epiteliais cornificadas, também podem aparecer em grandes grupos, sendo provenientes da descamação vaginal (FREEMAN, 1994). O citoplasma dessas células é granular e sua forma é por vezes irregular. Nesta fase o estrógeno começa a apresentar uma queda em sua concentração plasmática, em relação ao aumento de LH, retornando a valores basais (FREEMAN, 1994; SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975).

Durante o diestro 1 ou metaestro, que corresponde a fase de menor duração (6 a 8 horas), são vistos três padrões celulares: células epiteliais nucleadas e anucleadas e células inflamatórias, com predominância das inflamatórias, sendo os leucócitos menores que as células epiteliais (FREEMAN, 1994). Durante o diestro 1 os níveis de estradiol começam a aumentar e são mantidos no diestro 2, em relação a progesterona, que apresenta aumento progressivo a partir da tarde de proestro e atinge seu pico durante a manhã do diestro 1, seguido de uma redução abrupta na manhã do diestro 2, devido a regressão do corpo lúteo (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Já o diestro 2, maior fase, possui uma duração média de 55 a 57 horas e é visualizado no esfregaço a predominância de células inflamatórias. As fases de diestro 1 e 2 correspondem a fase secretora nos seres humanos, na qual a progesterona tem ação predominante (AJAYI; AKHIGBE, 2020; CORA; KOOISTRA; TRAVLOS, 2015; EKAMBARAM; KUMAR; JOSEPH, 2017; JOHNSON, 2018). Devido as similaridades no perfil hormonal e alterações morfológicas uterinas e ovarianas que ocorrem ao longo do ciclo reprodutivo de ratas e mulheres, a rata tem sido um dos modelos mais utilizados para estudos relacionados às alterações do sistema reprodutivo de mulheres durante o ciclo menstrual (AJAYI; AKHIGBE, 2020; CALIGIONI, 2010).

3.3 Hormônios sexuais

O ciclo estral da rata, semelhante ao que é observado em mulheres, é regulado por hormônios que desempenham papéis importantes não somente para o ciclo reprodutivo, como para a preparação do útero para a implantação e gestação. Estes hormônios são produzidos e regulados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) (GOLDMAN *et al.*, 2000). Os esteroides sexuais, estrógeno e progesterona, produzidos principalmente pelos ovários, sofrem flutuações em sua concentração plasmática em resposta aos estímulos hipotalâmicos e hipofisários. Primeiramente, ocorre a liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, com consequente síntese e secreção pulsátil dos

hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise. Estes, por sua vez, atuam nos ovários estimulando a síntese de estrógeno e progesterona. Estes hormônios serão reguladores positivos ou negativos da secreção das gonadotrofinas, a depender da concentração sérica dos mesmos (JOHNSON, 2018).

Estudos recentes têm aumentado a compreensão sobre a via de controle do eixo HPG, sendo que atualmente a kisspeptina é considerada o peptídeo chave da reprodução, uma vez que controla hierarquicamente a atividade dos neurônios GnRH (LEE; LEE; WANG, 2021). Produzida no núcleo arqueado (ARC) e na área periventricular anteroventral (AVPV) do hipotálamo, a kisspeptina (KP) é um neuropeptídeo secretado por neurônios denominados de *kiss1* na AVPV (CLARKSON *et al.*, 2009) e de *KNDy* no ARC (LEHMAN; COOLEN; GOODMAN, 2010). A denominação de *KNDy* se justifica pelo fato de os neurônios do ARC também secretarem neurocinina B e dinorfina, que regulam positivamente ou negativamente a secreção de kisspeptina, respectivamente. Através desses núcleos hipotalâmicos ela age intermediando o feedback positivo e negativo dos esteroides sexuais sobre a secreção de GnRH (SMITH, 2009).

Estudos demonstraram que os neurônios que sintetizam KP não somente possuem receptores para os esteroides sexuais, como modulam a secreção deles de acordo com as suas concentrações circulantes (SMITH *et al.*, 2006). Assim, em ratas, altas concentrações plasmáticas de estradiol, como observado no proestro, aumenta a expressão de kisspeptina no AVPV, enquanto reduz a expressão no ARC, sendo essa modulação responsável pelo pico pré-ovulatório de LH. Por outro lado, baixa concentração plasmática de estradiol, como visto no diestro, estimula a expressão de kisspeptina no ARC, sendo esse núcleo hipotalâmico responsável pela pulsatilidade do LH (CLARKSON *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2006). De forma semelhante, ovelhas ovariectomizadas apresentam aumento da expressão de *kiss1* no ARC, enquanto a administração de estradiol reduz a sua expressão (SMITH *et al.*, 2007).

Com a secreção das gonadotrofinas sob estímulo do GnRH, ocorre estímulo da foliculogênese ovariana, principalmente pela ação do FSH. As células da granulosa e da teca presentes no folículo ovariano secretam estrógeno progressivamente de acordo com o desenvolvimento folicular (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). A concentração desse esteroide aumenta no final do diestro, atingindo o pico na tarde do proestro (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). Nesse mesmo período, há maior secreção pulsátil do FSH, além do pico de LH, com conseqüente ovulação (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974).

Após o rompimento folicular, o folículo sofre luteinização e o corpo lúteo formado será responsável pela produção de estrógeno e progesterona, sendo este último o hormônio chave para manutenção da gestação (MURPHY, 2000). Caso não ocorra a gestação, a concentração plasmática de progesterona reduz após 55 a 57 horas (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Porém, se houver gestação, ocorre o aumento plasmático de prolactina (PRL), somado a outros fatores mantém a funcionalidade do corpo lúteo durante toda a gestação (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Dessa forma, como ocorre em outros mamíferos, o ciclo estral da rata pode ser dividido numa fase pré-ovulatória, caracterizada pelos altos níveis plasmáticos de estrógeno, e pós-ovulatória, com influência predominante da progesterona. Estas modificações no perfil hormonal resultam em alterações morfológicas e funcionais no trato reprodutivo das fêmeas (MURPHY, 2000).

3.4 Útero

O útero é um dos principais órgãos que formam o trato reprodutivo das fêmeas, sendo fundamental para a reprodução (SIKORA *et al.*, 2021). Nele ocorre a implantação embrionária, nutrição e proteção do concepto, além da manutenção da gestação. Ao final deste período, também é responsável pela expulsão do feto por meio das contrações uterinas (KELLEHER; DEMAYO; SPENCER, 2019; WATSON; CROSS, 2005). Macroscopicamente, o útero das ratas, como a maioria dos mamíferos domésticos, é bicornual (HAFEZ; HAFEZ, 2016; RATAJCZAK; FAY; MUGLIA, 2010). Microscopicamente, é dividido em três camadas principais: endométrio, miométrio e perimétrio (SIKORA *et al.*, 2021).

O endométrio corresponde a mucosa uterina e é a região onde ocorrem as principais alterações morfológicas durante o ciclo estral (SIKORA *et al.*, 2021). Esta região é altamente especializada e sofre diversas mudanças morfofisiológicas para a recepção do embrião e implantação. O revestimento epitelial é simples colunar, com algumas células ciliadas e células secretoras. O estroma é rico em fibroblastos e abundante matriz extracelular que circundam glândulas com epitélio semelhante ao do lúmen uterino. As mudanças cíclicas endometriais são divididas em fase proliferativa e fase secretora (SIKORA *et al.*, 2021).

A fase proliferativa em mulheres corresponde as fases de proestro e estro nas ratas, também conhecida como fase folicular ou estrogênica. Em resposta ao aumento dos níveis plasmáticos de estrógeno, ocorre aumento da proliferação luminal e glandular, do número de vasos sanguíneos e edema (AJAYI; AKHIGBE, 2020; SIKORA *et al.*, 2021; WESTWOOD, 2008). Logo após a ovulação, tem início a fase secretora ou luteal, que tem ação predominante

da progesterona (BUTCHER; COLLINS; FUGO, 1974). Este período corresponde as fases de metaestro e diestro e é caracterizado pela hipertrofia glandular, aumento a atividade secretória glandular e modificações no epitélio luminal que são fundamentais para a implantação e nutrição inicial do embrião (PATEL *et al.*, 2015; SIKORA *et al.*, 2021).

Caso ocorra a cópula e a concepção, o embrião será implantado no endométrio e as alterações uterinas responsivas a progesterona serão mais intensas. Ocorrerá diferenciação das células estromais para a formação da decídua. A decídua atua na fixação do tecido placentário, controla a invasão trofoblástica e protege o feto do sistema imunológico materno. Além disso, fornece fatores de crescimento e citocinas que auxiliam no remodelamento tecidual e vascular no local da implantação, garantindo a nutrição e desenvolvimento adequado do embrião (TEESALU; BLASI; TALARICO, 1996; ZHANG *et al.*, 2014).

A camada miometrial é composta por células musculares lisas que são responsáveis pela contração uterina no momento do parto (SIKORA *et al.*, 2021). Durante a gestação, essas células sofrem hiperplasia e hipertrofia em resposta ao aumento de estrógeno e progesterona, sendo que a sua contratilidade será modulada pelos níveis plasmáticos e/ou teciduais de ocitocina, prostaglandina e relaxina, além dos esteroides sexuais (KIRKLAND *et al.*, 1981; MALIK; ROH; ENGLAND, 2021).

O perimétrio é a camada mais externa do útero e é formado por vasos linfáticos, capilares sanguíneos, tecido conjuntivo frouxo e epitélio simples pavimentoso (mesotélio) (SIKORA *et al.*, 2021).

3.5 Tuba uterina

A tuba uterina realiza a comunicação entre os ovários e o útero e desempenha papel crucial para a reprodução. Morfologicamente, pode ser dividida em três segmentos: istmo, ampola e infundíbulo (HUNTER, 2005; LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976). Estes três segmentos, semelhante ao útero, são formados pela mucosa, camada muscular e serosa (SHIRLEY; REEDER, 1996).

O istmo, que é o segmento em contato com o útero, serve de reservatório para os espermatozoides e apresenta menor diâmetro luminal, mucosa menos pregueada e uma camada muscular mais espessa (HUNTER, 2005). O segmento intermediário é a ampola, local onde ocorre a fecundação e caracterizado por uma mucosa com dobras longitudinais maiores

(SHIRLEY; REEDER, 1996). O terceiro segmento da tuba uterina e que está em contato com o ovário é o infundíbulo, que tem a principal função de captar os ovócitos e transportá-los em direção a ampola. Este segmento é formado por dobras maiores da mucosa, também chamadas de fimbrias, e por uma musculatura lisa mais delgada quando comparado aos outros segmentos (LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976).

A mucosa da tuba uterina é a região que mais sofre alterações morfológicas em resposta aos hormônios sexuais, como também como resultado da função de cada um dos segmentos (LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976; SHIRLEY; REEDER, 1996). Assim, a captação dos gametas, a capacitação espermática e fecundação, o transporte do óvulo e do embrião e a nutrição inicial do embrião (ABE, 1996; SHIRLEY; REEDER, 1996) vão depender das células ciliadas e secretoras que formam o seu epitélio (LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976). Essas células variam na sua proporção de acordo com o segmento e a fase do ciclo estral (ABE, 1996; LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976). Nas fimbrias do infundíbulo tem o predomínio de células ciliadas e algumas células levemente apócrinas. A proporção dessas células é semelhante na região da ampola, além da presença de células secretoras. A quantidade dessas células secretoras aumenta durante o estro, tornam-se predominantes no metaestro e raras no diestro (SHIRLEY; REEDER, 1996). No istmo existe um predomínio de células secretoras, sendo que a quantidade dessas células aumenta ao se aproximar do útero, enquanto ocorre diminuição das células ciliadas e levemente apócrinas. Na transição da tuba uterina para o útero aparecem as células juncionais (ABE, 1996; LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976).

Uma vez que a mucosa da tuba uterina sofre modificações de acordo com os esteroides sexuais circulantes, em mulheres, durante a fase folicular, o estradiol estimula a hipertrofia epitelial, levando ao aumento da secreção celular e formação de mais cílios na mucosa tubária (JACQUES DONNEZ *et al.*, 1985). A progesterona, por outro lado, age negativamente sobre o batimento ciliar (BYLANDER *et al.*, 2013). Outro fator que influencia a atividade tubária é a contração da camada muscular, que em conjunto ao batimento ciliar atuam no transporte dos gametas e embriões, além de proteger o organismo contra a passagem de microrganismos do útero para a cavidade peritoneal. Essas contrações são também reguladas pelos esteroides sexuais (AKISON *et al.*, 2014; CRETOIU; LAURA SUCIU; POPESCU, 2010; OKADA *et al.*, 2003).

A secreção do epitélio tubário é rica em fatores de crescimento, glicoproteínas, eletrólitos entre outros, que variam de acordo com a fase estral (BRAÑES *et al.*, 2005; HUNTER, 1994, 2005). As características da secreção em cada segmento da tuba, somado às

diferenças morfológicas ao longo da tuba, contribuem para o desenvolvimento de ambientes distintos, sendo vital para o desenvolvimento adequado das diversas funções (HUNTER, 1994; LECHENE, 1976). É importante ressaltar que a presença de espermatozoides é outro fator que provoca modificações na secreção tubária (HUNTER, 1994, 2005). Ao tocarem no epitélio tubular, ocorre o reconhecimento da presença dos espermatozoides. Isso ativa mudanças no conteúdo da secreção, alterando o teor de proteínas e o acréscimo de antioxidantes, para assegurar melhor nutrição e proteção ao espermatozoide, além da sua capacitação (ELLINGTON *et al.*, 1993; LI; WINUTHAYANON, 2017; WINUTHAYANON *et al.*, 2015).

A tuba uterina também é responsável pela proteção contra o estresse oxidativo e primeiro aporte nutricional ao embrião recém formado, além de fornecer o ambiente adequado para seu desenvolvimento garantindo não só a temperatura e pH ideais, mas também fornecendo fatores essenciais para a suas clivagens (HUNTER, 1994; LI; WINUTHAYANON, 2017). Desse modo, fica evidente o papel crucial da tuba e dos fatores por ela produzidos para o sucesso da reprodução.

3.6 Moduladores da função uterina e tubária

O útero é um órgão totalmente responsivo às alterações hormonais que ocorrem ao longo do ciclo estral, principalmente em relação aos níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona, como visto anteriormente (MASSIMIANI *et al.*, 2020). Essas modificações ocorrem com a finalidade de tornar o útero receptivo ao embrião, permitindo a implantação embrionária e o estabelecimento da gestação (KELLEHER; DEMAYO; SPENCER, 2019; MASSIMIANI *et al.*, 2020; SURVEYOR *et al.*, 1995).

O estrógeno e a progesterona agem diretamente no útero, por meio dos seus receptores nucleares ER α , ER β e PR, modulando não somente a atividade celular como a expressão de outros fatores que influenciam a função uterina. O estradiol estimula a proliferação das diferentes células que compõem o endométrio uterino, tais como as células luminiais, glandulares e estromais, que é essencial para a preparação do útero para a implantação (FINN; MARTIN, 1970; GELFANT; MEYER; HANS, 1955; MASSIMIANI *et al.*, 2020). Camundongos nocautes para ER α , por exemplo, são inférteis e possuem endométrios hipoplásicos (CHEN *et al.*, 2009). O estradiol também regula a expressão de mucina 1, que é comumente expressa no epitélio luminal como barreira de proteção. No momento da implantação, a expressão de mucina 1 deve reduzir para permitir a implantação (AL-AZEMI *et*

al., 2009; CHAUHAN *et al.*, 2015; MESEGUER *et al.*, 2001; SURVEYOR *et al.*, 1995). A expressão do fator inibitório de leucemia (LIF), outro importante fator no processo de implantação, também é modulado positivamente pelo estrógeno. Redução da expressão uterina dessa citocina em ratas está associada a falha na implantação embrionária (LIANG *et al.*, 2014; SHAN *et al.*, 2019).

A progesterona, por outro lado, inibe a proliferação celular induzida pelo estradiol (LI *et al.*, 2011). A progesterona induz a decidualização durante a fase luteal, sendo esse processo vital para a implantação e o estabelecimento e manutenção da gestação (PATEL *et al.*, 2015). Semelhante ao que ocorre com o estradiol, a progesterona também regula e induz a expressão de fatores essenciais para o sucesso da gestação. Por meio da regulação positiva do gene *Hand2*, a progesterona suprime os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) (LI *et al.*, 2011), fatores estes que induzem a proliferação celular e são responsivos ao estímulo do estradiol. Camundongos nocautes para *Hand2* apresentam ausência de implantação e contínua proliferação das células endometriais (WETENDORF; DEMAYO, 2012).

A progesterona também regula fatores relacionados a implantação, fixação embrionária e diferenciação estromal, como a folistatina (FST). Este peptídeo regula a expressão do fator de crescimento transformador beta (TGF β), que está relacionado a receptividade embrionária. Camundongos nocautes para FST possuem respostas inadequadas aos esteroides sexuais. O útero permanece no estado não receptivo ao embrião, além de prejudicar a sinalização das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (FULLERTON *et al.*, 2017).

As BMPs são membros da super família do TGF β . Estudos tem demonstrado a importância da *BMP2* na decidualização, uma vez que em camundongos nocautes para este gene há implantação, porém o estroma não sofre a reação decidual (LEE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007). A *BMP2* também induz a expressão de *WNT4*, outro mediador da decidualização que é regulado positivamente pela progesterona (COOKE *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2007). O *WNT4* atua na diferenciação celular e desenvolvimento uterino (FRANCO *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2014). A progesterona também regula positivamente a expressão de *Indian hedgehog* (Ihh) e *Smo* (*Smoothened*), receptor do Ihh. Redução na expressão de *Smo* resulta em falhas na formação das glândulas endometriais (FRANCO *et al.*, 2010b, 2010a; KELLEHER; DEMAYO; SPENCER, 2019; WETENDORF; DEMAYO, 2012).

Semelhante ao útero, a tuba uterina também é responsiva aos esteroides sexuais, que regulam diversos fatores que influenciam a função tubária. Entre esses fatores estão a proteína

1 relacionada à Ras (RASD1), que modula o desenvolvimento da tuba uterina (JEONG *et al.*, 2018), e as aquaporinas (AQPs), que são transportadores de água transmembrana importantes para a formação do fluido tubário (BRANES *et al.*, 2005). A endotelina-2, também responsiva aos esteroides sexuais, estimula a contração muscular e o batimento ciliar, que junto ao fluido são essenciais para o transporte de gametas e do embrião (AL-ALEM *et al.*, 2007; CRETOIU; LAURA SUCIU; POPESCU, 2010; WIJAYAGUNAWARDANE *et al.*, 2001). A fetuina-b, também expressa na tuba uterina e responsiva ao estradiol, regula negativamente a ovastina, mantendo a permeabilidade da zona pelúcida para a penetração do gameta (DIETZEL *et al.*, 2013).

3.7 Efeitos do hipotireoidismo no sistema reprodutivo da fêmea

Os hormônios tireoidianos (HTs) influenciam a função de todos os sistemas do organismo, desde a vida intrauterina até o desenvolvimento pós-natal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). No sistema reprodutivo, sua ação pode ser direta por meio de receptores nucleares específicos presentes no ovário, útero e tuba uterina (EVANS; FARWELL; BRAVERMAN, 1983), como também indiretamente por meio da interação com outros hormônios (CIDLOWSKI; MULDOON, 1975; HAPON *et al.*, 2003; KIRKLAND *et al.*, 1981) e fatores de crescimento (OSORIO; RUIZ; ORTEGA, 1998; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2015).

O hipotireoidismo pode ser adquirido em qualquer fase da vida e é considerado como a principal endocrinopatia que acomete os animais e humanos (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). No sistema reprodutivo, distúrbios na produção hormonal da tireoide estão entre as principais causas de irregularidade do ciclo menstrual/estral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a), atraso da maturidade sexual ou puberdade precoce, aumento da frequência de abortos, cistos ovarianos, partos prematuros (KRASSAS, 2000), baixo peso ao nascer e comprometimento do desenvolvimento placentário (SANTOS *et al.*, 2022; SERAKIDES *et al.*, 2012), além de efeitos deletérios na decidualização (SOUZA *et al.*, 2017).

A deficiência de HTs desencadeia um quadro de hiperprolactinemia que também está associada a problemas reprodutivos e de infertilidade (HAPON; GAMARRA-LUQUES; JAHN, 2010; TOHEI *et al.*, 2000). O excesso de prolactina interfere na ciclicidade por inibir a expressão hipotalâmica de kisspeptina e, conseqüentemente, a secreção pulsátil de LH e FSH e

também o pico pré-ovulatório de LH (ARAÚJO-LOPES *et al.*, 2014; GRATTAN *et al.*, 2007). Além disso, estudos recentes demonstraram que o hipotireoidismo reduz a expressão hipotalâmica de kisspeptina (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a; TOMORI *et al.*, 2017).

A deficiência de T3 e T4 causa redução do peso ovariano e do número de folículos secundários, terciários e corpos lúteos (SILVA *et al.*, 2004) e aumenta a atresia folicular por causar estresse oxidativo no ovário (MENG *et al.*, 2016). Além disso, afeta a atividade luteal, com redução da expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2), da proliferação de células luteais e endoteliais e da apoptose luteal em animais gestantes e não gestantes (SILVA *et al.*, 2013; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014a). A redução de COX-2 está associada a diminuição de fatores luteolíticos como PGF2 α , 20- alfa HSD e aumento de fatores luteotróficos como PGE2 e da prolactina circulante (HAPON *et al.*, 2007). Desse modo, há prolongamento da fase luteal, aumentando não somente o tempo gestacional, bem como a duração da fase do diestro em animais não gestantes (HAPON *et al.*, 2003).

A produção e ação do estradiol também é afetada pelo hipotireoidismo (HAPON *et al.*, 2003). Isso ocorre devido ao aumento dos níveis plasmáticos de progesterona (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a) e prolactina que afetam negativamente a secreção das gonadotrofinas (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018) e a sinalização do estradiol nas células-alvo do sistema reprodutivo (HATSUTA *et al.*, 2004).

No útero, os HTs agem modulando a resposta celular ao estrógeno (BARBANEL; ASSENMACHER, 1982). Na deficiência dos HTs, as células ficam pouco responsivas, prejudicando a taxa de proliferação epitelial, estromal e da musculatura uterina, reduzindo o índice mitótico (KIRKLAND *et al.*, 1981). Em ratas hipotireoideas é observado também o menor número de glândulas endometriais e redução da espessura endometrial (SILVA *et al.*, 2004), além de redução da altura do epitélio luminal e do volume absoluto das células epiteliais (INUWA; WILLIAMS, 2006). Em contrapartida, estudos de hipotireoidismo em chinchilas demonstraram hiperplasia uterina com infiltração de células imunes, além de redução da expressão de PR e ER α (RODRÍGUEZ-CASTELÁN *et al.*, 2019). No miométrio, pesquisas já evidenciaram alterações na resposta contrátil a oxitocina e acetilcolina em ratas não gestantes (MEDEIROS; CALIXTO, 1989). No entanto, não somente o sistema reprodutivo da fêmea é afetado pelo hipotireoidismo, como também o da sua prole, uma vez que filhotes fêmeas de ratas com hipotireoidismo apresentam redução do peso ovariano e uterino (PARK; LEE, 2021).

Na tuba uterina, a deficiência de HTs em ratas causa redução significativa da altura e número das células do epitélio infundibular, reduzindo o tamanho das fimbrias (SILVA *et al.*, 2004). Essas alterações provavelmente podem comprometer a captação dos ovócitos e, conseqüentemente, o processo de fertilização (SILVA *et al.*, 2004).

3.8 Kisspeptina e seu receptor Kiss1r

A Kisspeptina (KP) é um peptídeo que realiza a sua ação via receptor 54 acoplado a proteína G (GPR54), que é comumente conhecido como Kiss1R. A KP é codificada pelo gene *Kiss1* (OHTAKI *et al.*, 2001) e foi descoberta inicialmente como supressora de metástase. Pouco tempo depois, foi descoberta a sua principal função na modulação da secreção pulsátil das gonadotrofinas (MESSAGER *et al.*, 2005) e que a sua ausência poderia resultar em hipogonadismo hipogonadotrófico (DE ROUX *et al.*, 2003).

Além da ação hipotalâmica bem conhecida de KP, estimulando os neurônios GnRH, estudos tem demonstrado em diferentes modelos animais que a KP pode também regular periféricamente a fertilidade. Já foi demonstrada a presença de KP e seu receptor em útero (SANTOS *et al.*, 2021; SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2018), tuba uterina (GAYTÁN *et al.*, 2007), placenta (HIDEN *et al.*, 2007; TERAOKA *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2014) e ovário (CAO *et al.*, 2019; CEJUDO ROMAN *et al.*, 2012; CIELESH *et al.*, 2017; GAYTAN *et al.*, 2014; GAYTÁN *et al.*, 2009; LAOHARATCHATHANIN *et al.*, 2015b; SANTOS *et al.*, 2021) tanto em humanos (CEJUDO ROMAN *et al.*, 2012) quanto em animais, como em roedores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a), cães (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2018) e gatos (SANTOS *et al.*, 2021).

Apesar de ter sido demonstrado que a sinalização de kisspeptina e seu receptor em tecidos periféricos não é essencial para a reprodução (KIRILOV *et al.*, 2013), é sugerido o seu papel modulatório nestes órgãos periféricos, garantindo melhor eficiência reprodutiva, pois quando alterada resulta em efeitos deletérios. Sabe-se que a KP nos ovários influencia o desenvolvimento folicular, a maturação do oócito e a esteroidogênese luteal (SANTOS *et al.*, 2022; PENG *et al.*, 2013). Fisiologicamente, em ratas, há aumento de *Kiss1* no ovário na fase pré-ovulatória (CASTELLANO *et al.*, 2006), sendo que camundongos haplo-insuficientes ou nocautes para *Kiss1r* no ovário e no oócito apresentam disfunção ovulatória prematura (GAYTAN *et al.*, 2014; RUOHONEN *et al.*, 2022). FERNANDOIS *et al.* (2016) demonstraram que a administração intraovariana de KP reduz o número de folículos atrais, via regulação negativa do receptor de FSH, enquanto o uso de um antagonista (P234) aumentou esses

folículos, demonstrando o papel regulatório de KP sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais (BAARENDS *et al.*, 1995; FERNANDOIS *et al.*, 2016).

Em contrapartida, um estudo *in vitro* realizado por SAADELDIN *et al.*, (2012) evidenciou no complexo cumulus-oócito de suínos uma regulação positiva do FSH na expressão gênica de *Kiss1R*. Além disso, o tratamento *in vitro* com KP aumentou a maturação oocitária e teve efeito pró apoptótico em blastocistos de suínos (SAADELDIN *et al.*, 2012). Efeitos semelhantes também foram observados em mulheres, onde o tratamento *in vivo* com KP-54 aumentou a expressão de receptores para FSH, LH e estrógeno em células da granulosa, além de genes de enzimas esteroidogênicas como *Star* e *3βHsd2* (OWENS *et al.*, 2018).

Na tuba uterina de ratas, pesquisas já evidenciaram que o sistema kisspeptinérgico é expresso em todas as fases estrais, com pico de expressão nas fases de proestro/estro. Isso sugere que a menor expressão tubária de KP em ratas em diestro pode prevenir a implantação ectópica neste órgão (GAYTÁN *et al.*, 2007), uma vez que a expressão uterina de kisspeptina é importante para a implantação embrionária em camundongos (SCHAEFER *et al.*, 2021).

Estudos tem demonstrado o papel da kisspeptina no processo de decidualização e implantação embrionária, não somente em camundongos (SCHAEFER *et al.*, 2021; CALDER *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014; ABDELKAREEM *et al.*, 2023) como também em mulheres (BABA *et al.*, 2015), sendo que kisspeptina estimula a expressão de LIF pelas glândulas endometriais, fator crucial para a implantação do embrião (ABDELKAREEM *et al.*, 2023; CALDER *et al.*, 2014b; ZHANG *et al.*, 2014). Por isso, a deleção de *Kiss1r* no útero de camundongos resulta em falhas na implantação embrionária, redução do tamanho da ninhada e aumento da mortalidade neonatal (SCHAEFER *et al.*, 2021). Além disso, *Kiss1r* regula negativamente a expressão uterina de ER α , de modo que falhas na expressão uterina de *Kiss1r* causa hiperexpressão do receptor de estrógeno e, conseqüentemente, altera a receptividade endometrial (SCHAEFER *et al.*, 2021).

Redução dos níveis plasmáticos de kisspeptina em mulheres está associado ao maior risco de abortos espontâneos (SHARMA *et al.*, 2020), como também a menor expressão uterina e placentária (WU *et al.*, 2014). Por outro lado, a kisspeptina tem sido utilizada como um fator preditivo de endometriose, uma vez que há aumento da concentração sérica (AKAD, 2022) e da expressão proteica uterina (TIMOLOGOU *et al.*, 2016) em mulheres com endometriose. Além disso, ratas hipotireoideas apresentam menor expressão hipotalâmica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a; TOMORI *et al.*, 2017) e placentária/decidual de kisspeptina e/ou do seu receptor

(SANTOS et al., 2022), mas não há estudos que tenham avaliado se o hipotireoidismo também altera a expressão uterina e tubária de kisspeptina e Kiss1R ao longo do ciclo estral.

4 CAPÍTULO I

Hipotireoidismo afeta a expressão de Kisspeptina/Kiss1r e de moduladores da receptividade uterina em ratas ao longo do ciclo estral

4.1 Introdução

Os hormônios tireoidianos influenciam a função uterina, exercendo papel essencial para a atividade reprodutiva normal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Redução dos seus níveis plasmáticos afetam a morfologia endometrial, a implantação embrionária e causa infertilidade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022b; SANTOS *et al.*, 2022; SHAN *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2017). Essas alterações ocorrem devido a redução da sinalização local por meio dos seus receptores e/ou a alterações na secreção ou expressão de outros fatores de crescimento e mediadores hormonais, principalmente os esteroides sexuais (INUWA; WILLIAMS, 2006; KIRKLAND *et al.*, 1981; KOWALCZYK-ZIEBA *et al.*, 2021; RODRÍGUEZ-CASTELÁN *et al.*, 2019; SHAN *et al.*, 2019).

Sabe-se que a morfofisiologia uterina é regulada principalmente pelo estrógeno e progesterona (MASSIMIANI *et al.*, 2020). A variação cíclica no perfil plasmático desses hormônios determinam as alterações uterinas que ocorrem ao longo do ciclo estral e que são essenciais para o sucesso reprodutivo (FINN; MARTIN, 1970; LI *et al.*, 2011). Enquanto o estrógeno estimula a proliferação endometrial e modula a expressão de mucina 1 e do fator inibidor da leucemia (LIF), fatores chaves durante a implantação embrionária (CHAUHAN *et al.*, 2015; FINN; MARTIN, 1970; GELFANT; MEYER; HANS, 1955; MASSIMIANI *et al.*, 2020; SHAN *et al.*, 2019), a progesterona inibe a proliferação celular induzida pelo estradiol (LI *et al.*, 2011), além de induzir a decidualização por meio da regulação gênica de *Hand2*, *Bmp2*, *Wnt4* e *Ihh*, importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação (LI *et al.*, 2007; COOKE *et al.*, 2012; WETENDORF; DEMAYO, 2012; PATEL *et al.*, 2015; FULLERTON *et al.*, 2017). Contudo, estudos recentes têm demonstrado que a sinalização local de kisspeptina, outro peptídeo chave da reprodução, também influencia a fisiologia uterina pelos esteroides sexuais. Redução da expressão uterina do receptor de kisspeptina (Kiss1r) em camundongos causa hiperexpressão do receptor de estrógeno alfa (ER α) e altera a receptividade endometrial (RUOHONEN *et al.*, 2022), resultando em falhas na implantação embrionária, redução do tamanho da ninhada e aumento da mortalidade neonatal (SCHAEFER *et al.*, 2021).

A kisspeptina é conhecida pelo seu papel em regular a secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (KOTANI *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, o desenvolvimento puberal e o ciclo menstrual/estral (CLARKSON *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2018, 2019). Redução da expressão hipotalâmica de kisspeptina foi observada em ratas com hipotireodismo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a; TOMORI *et al.*, 2017), como também foi demonstrado na decídua e placenta desses animais (SANTOS *et al.*, 2022). Contudo, não há informações se o hipotireoidismo também afeta a expressão uterina do sistema kiss1/kiss1R ao longo do ciclo estral/menstrual.

De fato, foi demonstrado que a sinalização periférica de kisspeptina não é essencial para a reprodução (KIRILOV *et al.*, 2013), porém estudos tem demonstrado o seus efeitos regulatórios nos tecidos periféricos como por exemplo em mulheres e camundongos fêmeas, kisspeptina apresenta maior expressão uterina durante o diestro (FAYAZI *et al.*, 2015; BABA *et al.*, 2014), como também foi observado em gatas e cadelas (SCHÄFER-SOMI *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2021), sugerindo a participação da kisspeptina na decidualização e implantação embrionária (BABA *et al.*, 2014). De fato, a redução da sinalização *in vitro* de kisspeptina compromete a decidualização de células estromais uterinas de camundongo (ZHANG *et al.*, 2014), sendo que camundongos nocautes para *Kiss1* ou seu receptor apresentam falhas na adenogênese e função das glândulas uterinas (León *et al.*, 2016). Além disso, eles apresentam redução da expressão uterina de LIF, um fator importante para a receptividade embrionária (CALDER *et al.*, 2014). Por outro lado, ratas com hipotireoidismo apresentam redução das glândulas endometriais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022), da expressão uterina de LIF e da taxa de implantação (Shan *et al.*, 2019), enquanto mulheres hipotireoideas também apresentam menor decidualização e expressão uterina reduzida de *HAND2*, *PRL* e *IGFBP-1* (KAKITA-KOBAYASHI *et al.*, 2020). No entanto, até o momento, não se sabe se o hipotireoidismo afeta a sinalização uterina dos esteroides sexuais ao longo do ciclo reprodutivo e se essas alterações estão associadas a mudanças na expressão local de Kiss e Kiss1r.

Desse modo, o presente estudo avaliou o perfil de expressão de kiss1/ kiss1r e a sinalização endometrial de estrógeno e progesterona no útero de ratas hipotireoideas ao longo do ciclo estral. Os achados demonstraram que o hipotireoidismo reduz a expressão uterina de kiss1 e kiss1r em ratas no diestro e estro, respectivamente, e que essas alterações estão associadas com mudanças na proliferação endometrial e na sinalização hormonal pelo estrógeno e progesterona.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Manejo animal e indução do hipotireoidismo

Foram utilizadas 42 ratas Wistar fêmeas provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas (7 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UESC (Protocolo n° 028/22). Após a visualização de dois ciclos estrais completos (proestro, estro, diestro), os animais foram separados, ao acaso, em dois grupos, hipotireoideo e controle, sendo cada um com 21 animais. O hipotireodismo foi induzido pela administração diária, por sonda orogástrica, de 4 mg/Kg de 6-propyl-2-thiouracil (PTU), em 3 ml de água destilada (DE OLIVEIRA et al., 2022). Os animais do grupo controle receberam água destilada como placebo. Os animais foram pesados a cada três dias e citologias vaginais foram realizadas diariamente.

4.2.2 Eutanásia e coleta de material

A eutanásia foi realizada com o uso da guilhotina entre o 14° e 16° dia do início do tratamento com PTU ou água nas fases de proestro (7 animais/grupo), estro (7 animais/grupo) ou diestro 1 (7 animais/grupo). O sangue foi colhido em tubos com heparina para obtenção de plasma e armazenado a -20°C para posteriores dosagens hormonais e de T4 livre para confirmação da indução da disfunção tireoidiana. Os animais em diestro e estro foram eutanasiados às 10:00 horas, enquanto os animais em proestro foram eutanasiados às 18:00 horas, período que corresponde ao pico de LH (CASTELLANO *et al.*, 2006).

Na necropsia foi coletado o útero e fragmentos do terço médio de cada corno uterino foram coletados em criotubos com Trizol, congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para avaliação da expressão gênica. O restante dos cornos uterinos foi fixado em paraformaldeído 4% por 20 horas e processados pela técnica de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 µm foram feitas no terço médio do corno uterino e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para posteriores avaliações histomorfométricas. Para a imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany).

4.2.3 Análise hormonal

O sangue obtido durante as eutanásias foi centrifugado a 3000 rpm por 20 min e o plasma obtido foi armazenado a -20°C. O plasma foi utilizado para a dosagem de E₂, P₄, LH e T₄ livre. A dosagem de T₄ Livre foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante (T₄ Livre, IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA; Sensibilidade: 0,04 µg/dl (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Os níveis de LH foram avaliados por ELISA ultrasensível, conforme descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2020). Os níveis plasmáticos de E₂ e P₄ foram avaliados usando o kit DRG (E₂ Elisa, EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Hamburgo, Alemanha) e kit de progesterona de rato (P₄ Elisa, RTC008R, Biovendor Research and Diagnostics Products, Brno, República Tcheca), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Para cada ELISA todas as amostras foram analisadas em um único ensaio.

4.2.4 Análise histomorfométrica

As lâminas de útero coradas com HE foram fotografadas com uma câmera digital Spot Color Insight (SPOT™, Sterling Heights, Michigan, USA). Foram realizadas quatro medidas da espessura do endométrio e do miométrio, em pontos equidistantes, com auxílio do software ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). Também foi determinado o número de glândulas endometriais presente em toda a secção histológica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022b; SILVA *et al.*, 2004).

4.2.5 Imuno-histoquímica

Secções histológicas do útero foram submetidas à análise imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-PR (sc-130071; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA), anti-ERα (6f11; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), anti-KISS-1 (sc-101246; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA), anti-KISS1R (HPA071913, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), e anti-MCM2/CDC-47 (sc-373702; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA).

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (NOVOLINK-POLYMER-DETECTION-SYSTEMS, Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). A recuperação antigênica foi realizada por 20 minutos usando uma solução de ácido cítrico (0,54 mol/L; pH 6; 98°C). As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 42 horas com o anticorpo primário. A incubação nas etapas de bloqueio de peroxidase endógena, soro bloqueio e estreptavidina peroxidase foram realizadas por 30 minutos em cada etapa. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 45 min e a diaminobenzidina (DAB) (DAB substrate system, Lab

Vision Corp., Fremont, CA, EUA) foi utilizada como cromógeno. Por fim, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução de fosfato tamponada (PBS) (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b).

Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1*, *Kiss1r*, $ER\alpha$, PR e CDC47 no útero. Para a avaliação quantitativa foram utilizadas 6 secções histológicas/grupo. Para determinar a área de imunomarcação, imagens foram fotografadas com um microscópio Olympus BX-40 e a câmera digital Spot Color Insight (SPOTTM, Sterling Heights, Michigan, USA) e foi utilizado o software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram realizadas. Os dados foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcação em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b). Também foi realizada a avaliação da porcentagem de células imunomarcadas para $ER\alpha$, PR e CDC47 no endométrio, considerando 100 células do epitélio luminal, 100 células do epitélio glandular superficial, 100 células do epitélio glandular profundo e 500 células do estroma endometrial.

4.2.6 qPCR em tempo real

A extração do RNA total foi feita pelo uso do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foi utilizado 1 µg de RNA para as reações de transcrição reversa utilizando o kit comercial GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Para as reações, foi utilizado 1,5 µL de cDNA, 100 nM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água.

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Para avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de melting dos produtos da amplificação. Os iniciadores para *Kiss1*, *Kiss1r*, *Hand2*, *Wnt4*, *Bmp2*, *Muc1*, *Lif*, *Esr1*, PR, *Smo* foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na

expressão de *Rpl7* ou *Gapdh* de *Rattus norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b; WINUTHAYANON *et al.*, 2015).

Tabela 2. Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real, no útero.

Gene	Iniciadores	Nº de acesso
<i>Kiss1r</i>	F: CAACCTGCTGGCCCTATAACC R: TGCAGGGCGCCATCAGT	NM_023992.2
<i>Kiss1</i>	F: GAGCCACTGGCAAAAATGGC R: ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC	NM_181692.1
<i>Hand2</i>	F: GAGGACGGACACGTTACTCG R: TGGGTTCTTGGGCGCTTATT	<u>NM_022696.2</u>
<i>Wnt4</i>	F: TTGTATACGCCATCTCTTCAGCA R: CACAGCCACACTTCTCCAGAT	<u>NM_053402.2</u>
<i>Bmp2</i>	F: TGCTTCTTAGACGGACTGCG R: GGGGAAGCAGCAAACTAGA	<u>NM_017178.2</u>
<i>Muc1</i>	F: TGTTTCTACCCCTTTCCCGC R: CTGCGGACTTTTAGGCTTGC	<u>NM_001398538.1</u>
<i>Lif</i>	F: CAGGGATTGTGCCCTACTG R: GGTGGCATTACAGGGGTGA	<u>NM_022196.3</u>
<i>Esr1</i>	F: GCCACTCGATCATTCGAGCA R: CCTGCTGGTTCAAAGCGTC	<u>NM_012689.1</u>
<i>Pgr</i>	F: CTTCCAGACTGCACCTACC R: AGGCTGGAATTCGCCGTAAA	<u>NM_022847.2</u>
<i>Smo</i>	F: CTGACTGGCGGAACTCCAAT R: GCCCACAAGAAACACGCAT	<u>NM_012807.2</u>
<i>Rpl7</i>	F: TATGTGCCCGCAGAACCAAA R: TTGAAGATCTGCCGGAGACG	<u>NM_001100534.1</u>
<i>Gapdh</i>	F: ACAGCCGCATCTTCTTGTGC R: GCCTCACCCCATTTGATGTT	NM_017008.4

4.2.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm SEM. Realizou-se o teste *t* de Student não-pareado para comparações entre dois grupos, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2®. As análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4.2 Resultados

4.3.1 O hipotireoidismo altera a ciclicidade e o perfil plasmático de LH e dos hormônios sexuais de ratas ao longo do ciclo estral

A indução do hipotireoidismo pela administração de PTU foi confirmada por meio da redução significativa dos níveis de T4 livre nos animais hipotireoideos em relação ao grupo controle (Figura 1A). Os animais foram pesados no início do experimento e no dia da eutanásia e o ganho de peso foi avaliado (Figura 1 B), mas não houve diferença significativa entre o peso inicial e final entre os grupos. O hipotireoidismo alterou a ciclicidade dos animais, aumentando significativamente o número de dias em diestro quando comparado ao controle (Figura 1 C; ***P < 0,001).

Para avaliar se a alteração da ciclicidade observada no hipotireoidismo estava associada a alterações nos hormônios reprodutivos, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de LH, E₂ e P₄. Os animais hipotireoideos apresentaram uma redução na concentração plasmática de LH no proestro comparado ao controle (Figura 1 D; **P < 0,01), como também foi observado no E₂ (Figura 1 E; **P < 0,01). Em relação a P₄, houve uma redução significativa nos animais hipotireoideos em estro (Figura 1 F; *** P < 0,001) e uma tendência de redução no proestro (P = 0,054) comparado ao controle. Por outro lado, os animais hipotireoideos em diestro apresentaram um aumento na concentração plasmática de P₄ em relação ao controle (Figura 1 F; * P < 0,05).

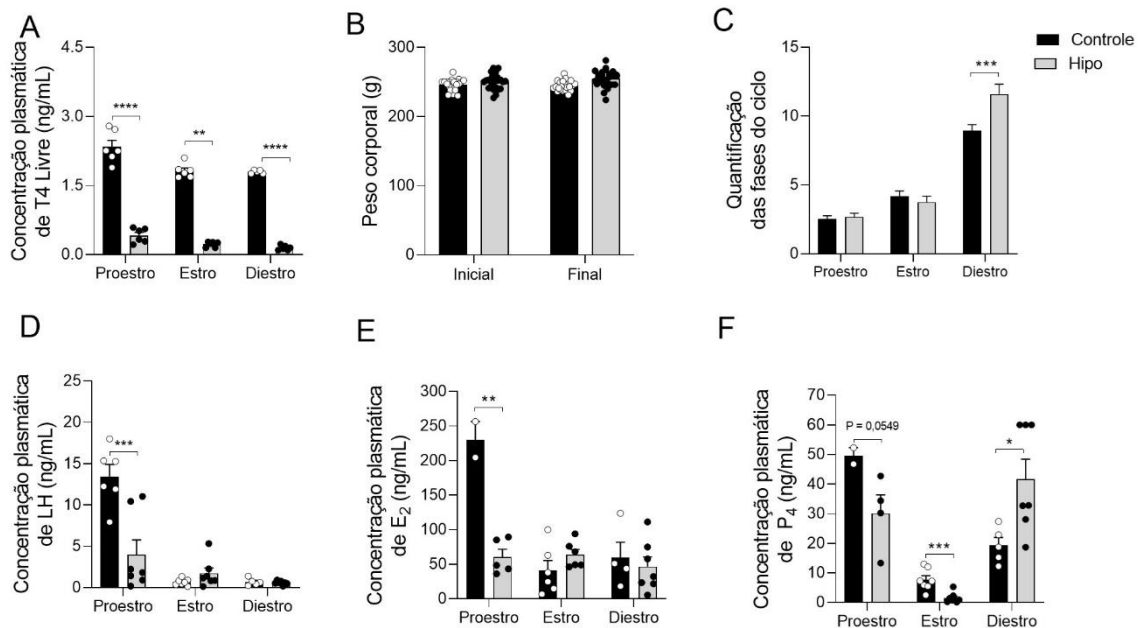


Figura 1. Confirmação do hipotireoidismo e avaliação do peso corporal, ciclicidade e hormônios reprodutivos de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Dosagem plasmática de T4 livre; B) Peso corporal; C) Quantificação das fases do ciclo estral; D) Concentração plasmática de LH; E) Concentração plasmática de Estradiol (E₂); F) Concentração plasmática de Progesterona (P₄). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

4.3.2 O hipotireoidismo altera a atividade proliferativa uterina de ratas ao longo do ciclo estral

Uma vez que o hipotireoidismo causou alterações na ciclicidade e no perfil hormonal dos esteroides sexuais das ratas, avaliamos também a morfologia uterina dos animais hipotireoideos ao longo do ciclo estral. Na avaliação macroscópica do útero, não foram observadas diferenças significativas no peso uterino entre os grupos nas três fases do ciclo (Figura 2A). Já em relação a microscopia, o hipotireoidismo causou um aumento na espessura endometrial no diestro comparado ao controle (Figura 2B-C; *P < 0,05), enquanto reduziu o número de glândulas endometriais/secção uterina no proestro e estro (Figura 2D; P < 0,05).

Considerando essa alteração na espessura endometrial e no número de glândulas endometriais, foi realizada também a análise da atividade proliferativa no epitélio luminal e glandular e das células estromais por meio da imunomarcagem de CDC47 (Figura 2D). Houve redução significativa durante o proestro (Figura 2E; *P < 0,05) e diestro (Figura 2E; **P < 0,01). Interessantemente, houve redução significativa da porcentagem de células imunomarcadas nas

células estromais (Figura F; $**P < 0,01$) no proestro enquanto no diestro uma redução no epitélio glandular (Figura H; $**P < 0,01$) dos animais hipotireoideos comparado ao controle.

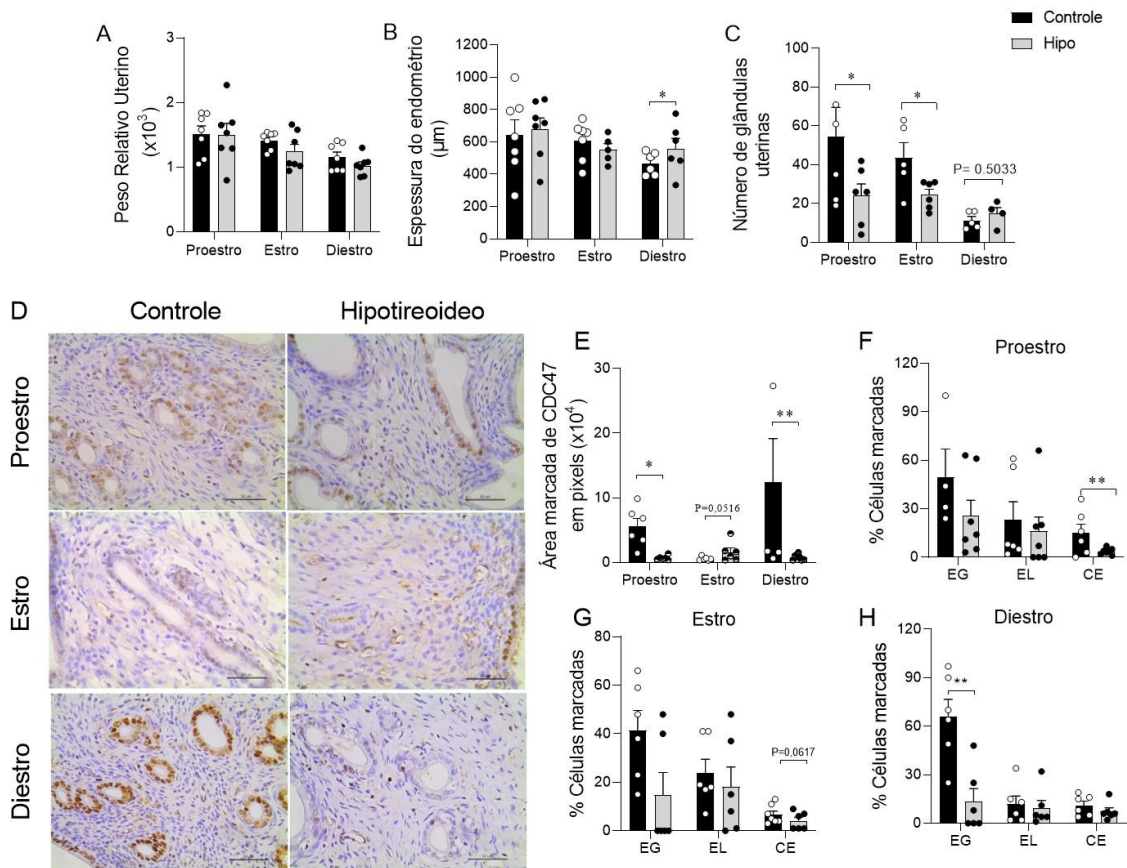


Figura 2. Morfologia uterina e atividade proliferativa endometrial de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Peso uterino; B) Espessura do endométrio; C) Número de glândulas endometriais. D) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de CDC47 no útero (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μm); E) Área de imunomarcção em pixels da expressão de CDC47 no útero. F-H) Porcentagem de células imunomarcadas para CDC47 no proestro (F), estro (G) e diestro (H). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student $*P < 0,05$, $**P < 0,01$. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais

4.3.3 O hipotireoidismo altera a expressão uterina de ER α e PR em ratas ao longo do ciclo estral

Uma vez que a atividade proliferativa uterina é modulada pela sinalização dos esteroides sexuais (FINN; MARTIN, 1970), avaliamos a imunomarcção endometrial e expressão gênica uterina de ER α e PR. Observou-se marcação de ER α em todas as fases estrais nos compartimentos endometriais (epitélio luminal, glandular e estroma). No proestro, a imunomarcção foi mais intensa, destacando-se forte marcação nuclear e variação de moderada a forte no citoplasma das células epiteliais luminiais e glandulares. O hipotireoidismo causou

uma intensa redução da imunomarcção endometrial, tanto a nível nuclear quanto citoplasmático, em todo o endométrio (epitélio glandular e luminal e células estromais) no proestro comparado ao controle (Figura 3A-B e 3E; **** $P < 0,0001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). No diestro, a marcação foi moderada, com destaque para as glândulas, apresentando marcação tanto no núcleo quanto no citoplasma. No grupo hipotireoideo, houve também uma redução da imunomarcção endometrial no diestro, principalmente nas células do epitélio luminal no diestro (Figura 3A-D e E; ** $P < 0,01$). Por outro lado, no estro, apesar da marcação fraca em todo o endométrio, com redução da imunomarcção citoplasmática que passou a variar fraca a ausente, sendo as glândulas o ponto com maior marcação, os animais hipotireoideos apresentaram um aumento na imunomarcção endometrial comparado ao controle (Figura E; ** $P < 0,01$). Na avaliação dos transcritos gênicos, semelhante à imunomarcção, houve redução da expressão de *Era* nos animais hipotireoideos em diestro em relação ao controle (Figura 3F; *** $P < 0,001$), enquanto não houve alteração significativa nas fases de proestro e estro ($P > 0,05$).

Em relação ao PR, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcção endometrial em todas as fases do ciclo comparado ao controle (Figura 4A e E; *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$), com maior porcentagem de células imunomarcadas no epitélio luminal e células estromais no proestro (Figura 4B; ** $P < 0,01$) e no epitélio glandular do diestro (Figura 4D; * $P < 0,05$). Na análise da expressão gênica de *Pgr*, semelhante ao *Era*, também foi observada uma redução uterina nos animais hipotireoideos em diestro em relação ao controle (Figura 2F; * $P < 0,05$), enquanto nas outras fases não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$).

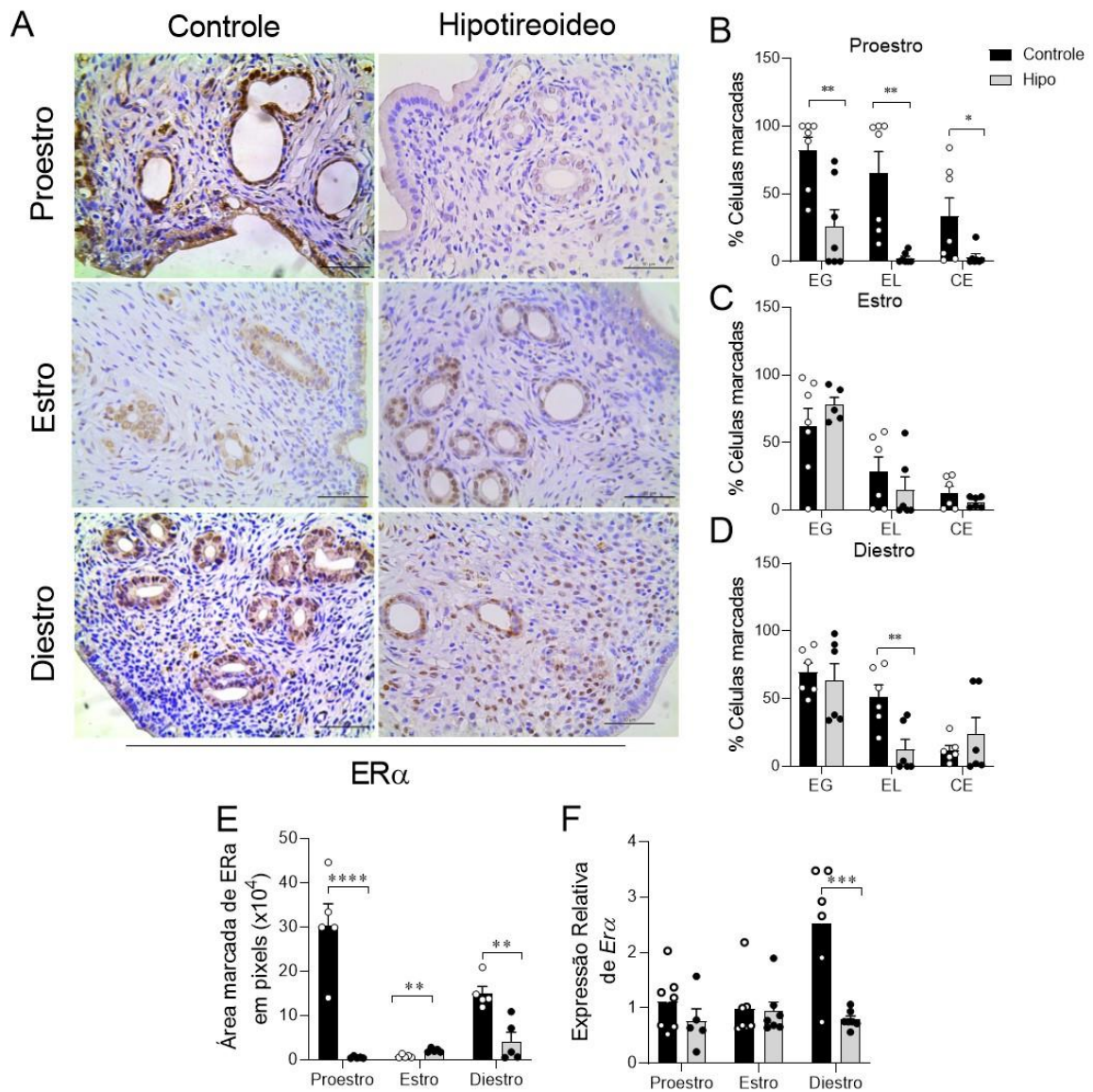


Figura 3. Expressão de ER α no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ER α (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-D) Porcentagem de células imunomarcadas para ER α no epitélio luminal e glandular e estroma nas fases de proestro (B), estro (C) e diestro (D). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão endometrial de ER α . F) Expressão gênica relativa do *Era*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais.

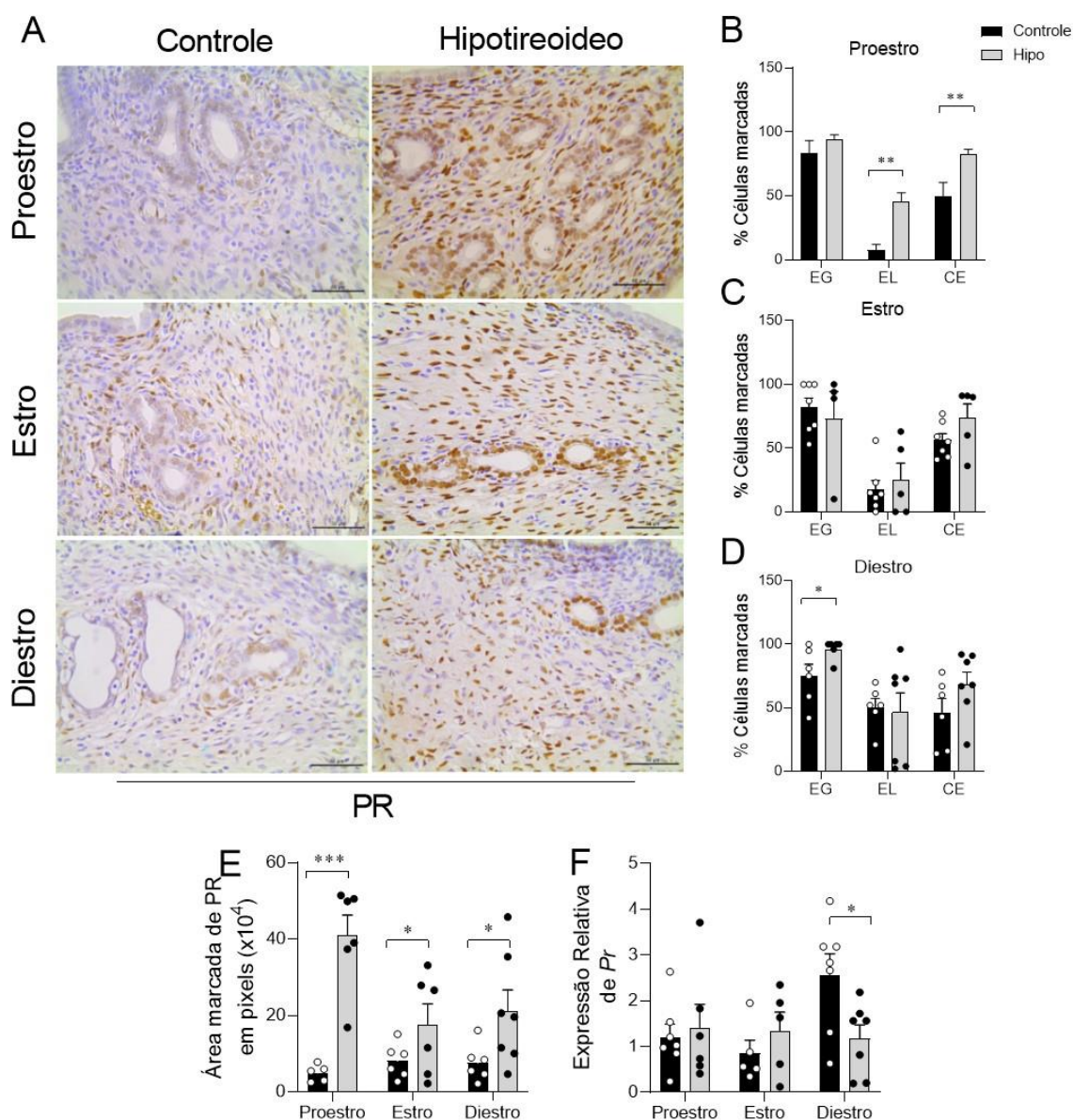


Figura 4. Expressão de PR no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de PR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B-D) Porcentagem de células imunomarcadas para PR no epitélio luminal e glandular e estroma nas fases de proestro (B), estro (C) e diestro (D). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão endometrial de PR. F) Expressão gênica relativa do *Pgr*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. EL= epitélio luminal; EG= epitélio glandular; CE= células estromais

4.3.4 O hipotireoidismo reduz a expressão gênica uterina de *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4* e *Hand 2*, em ratas ao longo do ciclo estral

Pelo fato do hipotireoidismo ter alterado a expressão uterina de $ER\alpha$ e PR, buscamos avaliar se havia alteração na expressão gênica de mediadores importantes para a função uterina

e que são responsivos ao E₂ e P₄. Para isso, inicialmente avaliamos a expressão de *Muc1* e *Lif*, que são responsivos ao E₂ (PAWAR *et al.*, 2015; SURVEYOR *et al.*, 1995). Em relação a *Muc1*, não houve diferença significativa entre os grupos hipotireoideo e controle ao longo do ciclo estral (Figura 5A). No entanto, redução da expressão gênica uterina de *Lif* foi observada nos animais hipotireoideos em diestro comparado ao controle (Figura 5B; *P < 0,05). Já em relação aos genes responsivos a P₄, houve uma redução significativa de *Bmp2* (**P < 0,01), *Wnt4* (**P < 0,01) e *Hand2* (**P < 0,01) nas ratas hipotireoideas em diestro comparado ao controle (Figura 5C-E), como também no estro para *Hand2* (**P < 0,01). Não houve diferença significativa para *Smo* entre os grupos ao longo do ciclo estral (Figura 5F; P > 0,05).

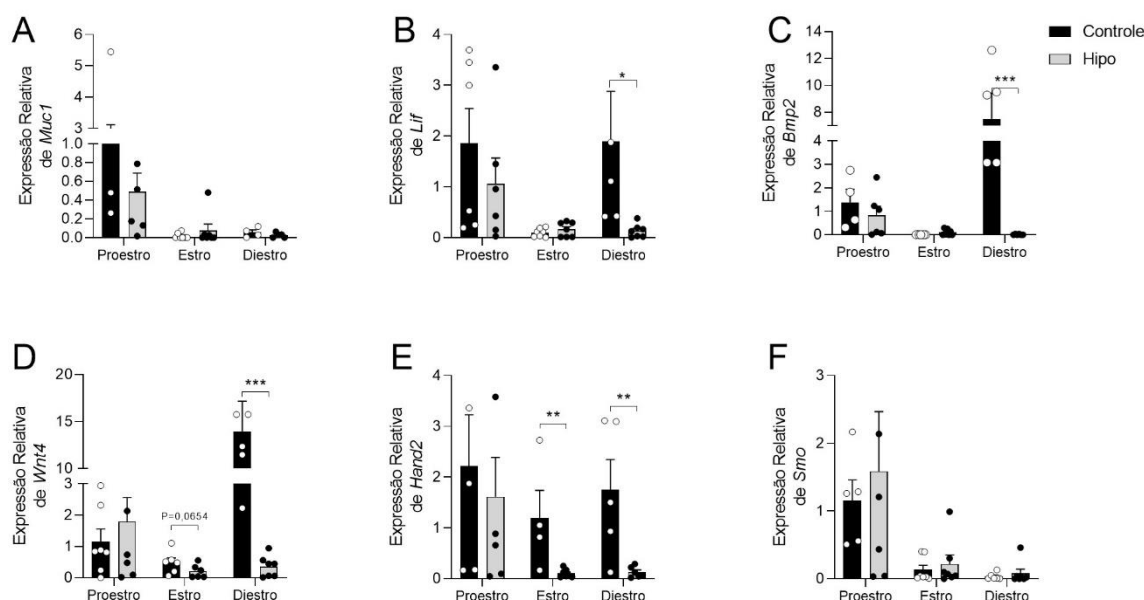


Figura 5. Expressão gênica de *Muc1*, *Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2*, *Smo* no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Expressão gênica relativa de *Muc1* no útero. B) Expressão gênica relativa de *Lif* no útero. C) Expressão gênica relativa de *Bmp2* no útero. D) Expressão gênica relativa de *Wnt4* no útero. E) Expressão gênica relativa de *Hand2* no útero. F) Expressão gênica relativa de *Smo* no útero. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.3.5 O hipotireoidismo reduz a expressão uterina de *Kiss1* e *Kiss1r* em ratas durante o ciclo estral

Uma vez que o hipotireoidismo alterou a sinalização uterina dos esteroides sexuais, foi avaliada também a expressão proteica e gênica de *Kiss1* e seu receptor *Kiss1R*, pois estudos demonstraram que kisspeptina regula a expressão de ER α no útero de camundongos (SCHAEFER *et al.*, 2021). A imunomarcação de *Kiss1* no útero foi citoplasmática, discreta e

ocorreu em todas as fases do ciclo estral (Figura 5 A). Foi observada marcação fraca a moderada no epitélio luminal e glandular, principalmente no proestro e estro, como também no estroma, evidenciado mais no diestro (Figura 6A). A análise da área de imunomarcação demonstrou que houve redução significativa de *Kiss1* no endométrio dos animais hipotireoideos em diestro comparado ao controle (Figura 6C; *** $P < 0,001$), enquanto nas outras fases do ciclo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). A análise dos transcritos gênicos de *Kiss1* não apresentou diferença significativa entre os grupos durante o ciclo estral (Figura 5 D).

A imunomarcação de *Kiss1R*, semelhante a *Kiss1*, foi citoplasmática, discreta, no epitélio luminal e glandular e nas células estromais, independente da fase do ciclo estral (Figura 6B). Na análise da área de imunomarcação não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 6C; $P > 0,05$). Contudo, na avaliação da expressão do mRNA de *Kiss1r*, uma redução significativa foi observada nos animais hipotireoideos em proestro comparado ao controle (Figura 6F; ** $P < 0,01$), enquanto não teve diferença nas outras fases do ciclo estral ($P > 0,05$).

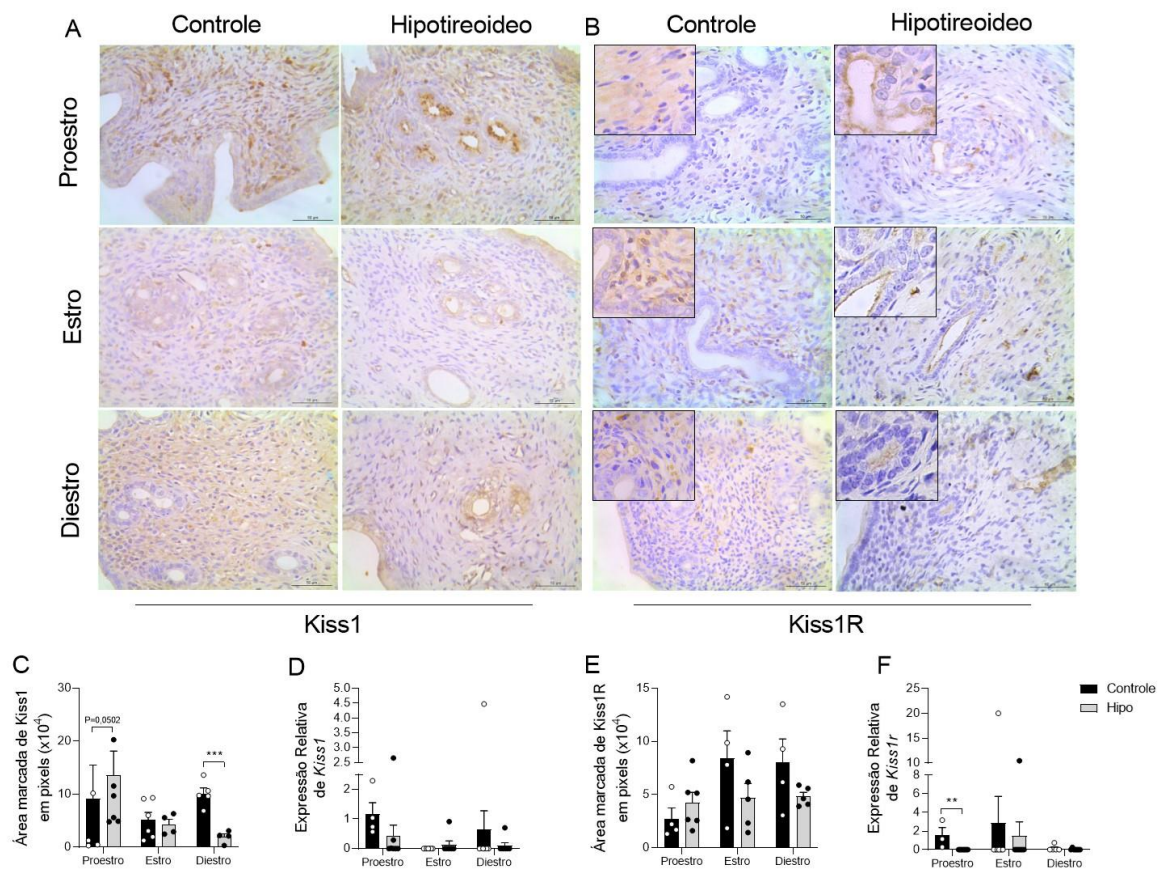


Figura 6. Expressão gênica de *Kiss1* e *Kiss1R* no útero de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A-B) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* (A) e *Kiss1R* (B) (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). C e E) Área de

imunomarcção em pixels da expressão endometrial de Kiss1 (C) e Kiss1R (E). D e F) Expressão gênica relativa do *Kiss1* (D) e *Kiss1r* (F). As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01, ***P < 0,001.

4.4 Discussão

O presente estudo demonstrou que o hipotireoidismo em ratas desregula a sinalização uterina de E₂ e P₄ ao longo do ciclo estral, com alteração na modulação de genes (*Lif*, *Bmp2*, *Wnt4*, *Hand2*) que são responsivos a esses hormônios e vitais para a função uterina adequada. Além disso, essas alterações estavam associadas com uma redução da expressão proteica e gênica uterina de *Kiss1* e *Kiss1r*, respectivamente no diestro e proestro, respectivamente, além de alterações na ciclicidade e no perfil hormonal de E₂, P₄ e LH.

As ratas hipotireoideas permaneceram mais dias na fase de diestro, além de terem apresentado aumento de P₄ durante o diestro e redução de LH e E₂ na tarde do proestro. Esses achados estão de acordo com DE OLIVEIRA et al. (2022a) e HATSUTA et al., (2004) que também observaram em ratas com hipotireoidismo maior permanência no diestro e aumento nos níveis de P₄, alterações que são resultantes do retardo na regressão luteal e aumento de enzimas esteroidogênicas no corpo lúteo (MATTHEIJ et al., 1995; HAPON et al., 2007; DE OLIVEIRA et al., 2022a). HAPON et al. (2003), por sua vez, relatou a redução dos níveis de E₂ e LH em ratas virgens hipotireoideas, semelhante ao nosso estudo, contudo não observou o aumento de P₄. Sabe-se que o hipotireoidismo compromete a secreção de FSH (HATSUTA et al., 2004), como também o pico de LH (MATTHEIJ et al., 1995), afetando a ovulação e o desenvolvimento folicular (DE OLIVEIRA et al., 2022a). Essas alterações podem ser a causa da redução observada nos níveis de E₂, como também da P₄, nas fases de proestro e estro, respectivamente.

O hipotireodismo nas ratas também reduziu o número de glândulas endometriais durante o proestro e estro, que provavelmente é resultante da redução plasmática do E₂. Esses achados corroboram com estudos anteriores que também identificaram uma diminuição no número de glândulas uterinas em ratas hipotireoideas durante o diestro (DE OLIVEIRA et al., 2022b; SILVA et al., 2004). A menor quantidade dessas glândulas, observada no presente estudo nas fases de proestro e estro, foi acompanhada de uma redução na atividade proliferativa endometrial no proestro, em especial de células estromais e do epitélio glandular, evidenciada pela menor imunomarcção de CDC47 na fase de proestro e diestro. KIRKLAND et al. (1981) também demonstrou no útero de ratas hipotireoideas uma diminuição na taxa proliferativa das células epiteliais, estromais e musculares. Além disso, estudos prévios com ratas hipotireoideas

observaram redução na taxa proliferativa em outros órgãos como na placenta (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b), corpo lúteo (SILVA *et al.*, 2013; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014a) e células da granulosa (SILVA *et al.*, 2004).

Contudo, a redução na atividade proliferativa uterina observada no presente estudo foi acompanhada não somente da redução do E₂ plasmático, como também da redução da expressão proteica e gênica uterina de ER α e aumento da imunomarcção endometrial de PR. Sabe-se que o E₂ estimula a proliferação endometrial por meio do seu receptor ER α (FISHMAN *et al.*, 1996; SHAN *et al.*, 2019; MASSIMIANI *et al.*, 2020), enquanto a P₄ inibe a proliferação celular induzida pelo estradiol (LI *et al.*, 2011; TAS *et al.*, 2013). Condizente com nossos resultados, BARBANEL; ASSENMACHER, (1982) observaram no hipotireoidismo neonatal redução de ER α no útero, como também na hipófise e hipotálamo, enquanto um estudo em camundongos mostrou que o tratamento com P₄ durante a janela neonatal inibiu a adenogênese uterina (COOKE *et al.*, 2012). Mas é importante ressaltar que houve um aumento na imunomarcção endometrial de ER α nas ratas hipotireoideas em estro. Esse resultado condiz com o observado por RODRÍGUEZ-CASTELÁN *et al.* (2019) em coelhas hipotireoideas, que também descreveram hiperplasia uterina nesses animais.

No entanto, de modo interessante, o grupo hipotireoideo exibiu um aumento da espessura endometrial no diestro. Esse resultado não condiz com o observado por INUWA; WILLIAMS (2006) e DE OLIVEIRA *et al.* (2022a) que relataram redução da espessura endometrial em ratas hipotireoideas. Contudo, esses estudos prévios foram realizados com hipotireoidismo crônico, seis semanas (INUWA; WILLIAMS, 2006) e três meses (DE OLIVEIRA *et al.* (2022a) de indução com metimazole e propiltiouracil, respectivamente. Além disso, esse aumento do endométrio pode estar associado ao maior tempo no diestro e do edema local, causados pelo aumento da P₄ plasmática observado nesses animais (GRUNERT; TCHERNITCHIN, 1982; LJUNGKVIST, 1975).

Estudos anteriores demonstraram que a expressão de ER α no útero é predominantemente nuclear, marcando as células do epitélio luminal, glandular e estromais (COOKE *et al.*, 1997; HIROI *et al.*, 1999), semelhante ao nosso estudo. Contudo, na fase de proestro e diestro, verificamos que teve uma redução acentuada da imunomarcção citoplasmática de ER α nas ratas hipotireoideas. A expressão citoplasmática de ER α está envolvida na ativação de vias de sinalização como a fosfatidilinositol-3-quinase (MORIYAMA *et al.*, 2020; RAZANDI *et al.*, 1999), sugerindo que essa sinalização esteja reduzida nos animais hipotireoideos. De fato, a sinalização estrogênica estava reduzida no útero desses animais, uma

vez que teve redução da expressão gênica do *Lif* no diestro, um gene responsivo ao E₂ (PAWAR *et al.*, 2015; SHEN; LEDER, 1992) e que desempenha um papel essencial na implantação (STEWART *et al.*, 1992; CALDER *et al.*, 2014). SHAN *et al.* (2019) também demonstraram redução da expressão uterina de LIF e seu receptor na janela de implantação de ratas com hipotireoidismo. Além disso, camundongos tratados com progestágenos (levonorgestrel) (MATSUO *et al.*, 2020) e com redução de glândulas endometriais (FILANT; SPENCER, 2013) apresentam redução significativa da expressão gênica uterina de *Lif*, o que corrobora com os achados do presente estudo, uma vez que as ratas hipotireoideas apresentavam não somente aumento dos níveis plasmáticos de P₄ como também da imunomarcagem endometrial de PR. Corroborando com nossos resultados, HAN *et al.* (2005) demonstraram em camundongos que após seis horas de administração de P₄ houve um aumento da expressão de PR em todos os compartimentos endometriais (epitélio luminal e glandular e células estromais).

Contudo, de maneira interessante, apesar dos altos níveis de P₄ plasmática e aumento da expressão proteica uterina de PR, o hipotireoidismo reduziu a expressão gênica de *Pr* no diestro, sugerindo uma falha na sinalização uterina pela P₄ e que pode ser resultado do feedback negativo da P₄ no seu próprio receptor (VERHAGE *et al.*, 1983). No presente estudo houve redução significativa nos animais hipotireoideos em diestro de genes responsivos a P₄ e que são mediadores da receptividade uterina. As ratas hipotireoideas apresentaram redução da expressão gênica de *Bmp2*, *Wnt4* e *Hand2*, inclusive com redução de *Hand2* no estro. A BMP2 é necessária para a decidualização (LEE *et al.*, 2007) e regula a expressão de *Wnt4*, que por sua vez está relacionado a diferenciação celular durante a reação decidual (FRANCO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2007). Já o *Hand2* suprime fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) induzidos pelo estrógeno (LI *et al.*, 2011). Em concordância com nossos resultados, KAKITA-KOBAYASHI *et al.* (2020) observaram o aumento de *Hand2* em culturas de células estromais uterinas humanas após o tratamento com levotiroxina (T4).

Uma vez que estudos em camundongos demonstraram que a sinalização estrogênica uterina é também influenciada pela atividade do receptor de Kiss1 (*Kiss1r*) (SCHAEFER *et al.*, 2021), e a kisspeptina é um fator importante para a implantação embrionária e o processo de decidualização (BABA *et al.*, 2015; SCHAEFER *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2014), também avaliamos a expressão proteica e gênica de Kiss1 e *Kiss1r* no útero das ratas. Interessantemente, o hipotireoidismo reduziu a imunomarcagem de Kiss1 nas ratas em diestro, principalmente no estroma, e reduziu a expressão gênica de *Kiss1r* no proestro. Redução da expressão de kisspeptina também foi relatado no hipotálamo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022b; TOMORI *et al.*,

2017), na placenta e decídua de ratas hipotireoideas (SANTOS *et al.*, 2022). Redução da expressão uterina de kisspeptina está associada a falhas na implantação embrionária e aborto (CALDER *et al.*, 2014a; PARK *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014), inclusive com redução da expressão uterina de LIF (CALDER *et al.*, 2014a), corroborando os resultados deste estudo.

Curiosamente, SCHAEFER *et al.* (2021) demonstraram que animais nocautes para *Kiss1r* no útero apresentam hiperexpressão do receptor de estrógeno, sendo que no nosso estudo as ratas hipotireoideas apresentaram redução da expressão gênica de *Kiss1r* no proestro. Talvez essa redução observada no proestro esteja associada a maior expressão proteica de ER α observada nesses animais no estro, uma vez que o ciclo estral da rata é muito curto e ficam em proestro somente por 14 horas (AJAYI; AKHIGBE, 2020). Um estudo em gatas demonstrou que a expressão gênica e proteica uterina de Kiss1R ocorre principalmente no proestro/estro, principalmente no epitélio luminal e glandular (SANTOS *et al.*, 2022), sendo que camundongos com ablação global para *Kiss1* ou *Kiss1r* apresentam supressão do crescimento uterino e da formação glandular (LEÓN *et al.*, 2016), o que corrobora também para a redução das glândulas endometriais observadas nos animais deste estudo.

Este estudo demonstrou que as alterações na ciclicidade e morfologia uterina de ratas com hipotireoidismo estão associadas com desregulação da sinalização uterina de E₂ e P₄ ao longo do ciclo estral, além da redução da expressão uterina de *Kiss1* e *Kiss1r*. Essas alterações provavelmente estão envolvidas nas disfunções reprodutivas causadas pelo hipotireoidismo.

4.5 Conclusão

Os resultados desta pesquisa revelaram que as alterações morfofisiológicas observadas no útero de ratas com hipotireoidismo estão associadas não apenas à desregulação plasmática nos níveis dos esteroides sexuais, mas também a uma irregularidade na sinalização uterina dos receptores destes esteroides, assim como de genes que orquestram as ações uterinas. Além disto, observou-se que a expressão de kisspeptina quanto do seu receptor, assim como no hipotálamo encontra-se desregulada no útero de animais hipotireoideos.

5 CAPÍTULO II

Hipotireodismo desregula a expressão de receptores dos esteroides sexuais e de moduladores da função tubária em ratas em proestro

5.1 Introdução

Disfunções na tuba uterina são importantes causas de infertilidade feminina (AL SUBHI *et al.*, 2013), uma vez que é o órgão responsável pelo transporte e suporte nutricional dos gametas no período que antecede a fertilização, assegurando sua viabilidade (HARPER, 1973; HUNTER, 1994; LI; WINUTHAYANON, 2017), como também do próprio embrião nos primeiros estágios da clivagem (HUNTER, 1994; WINUTHAYANON *et al.*, 2015). Contudo, o papel das alterações tubárias nas disfunções reprodutivas causadas por doenças metabólicas é pobremente conhecido (ATTAR, 2004; LAVY; DECHERNEY, 1987), principalmente na condição do hipotireoidismo (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018).

A hipofunção tireoidiana é uma das principais endocrinopatias que afetam a fertilidade feminina, pois causa atraso do início da puberdade, anovulação, cistos ovarianos, irregularidade menstrual (POPPE; GLINOER, 2003), aumento da frequência de abortos espontâneos e nascimento de neonatos prematuros de baixo peso e com anomalias congênitas (KRASSAS, 2000; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). GEVA *et al.* (1997) reportaram aumento de anticorpos anti-tireoidianos em mulheres com oclusão tubária, enquanto outro estudo demonstrou aumento da prevalência de hipotireoidismo subclínico em mulheres com distúrbios na tuba uterina (ABALOVICH *et al.*, 2007). Mittag *et al.* (2007) também demonstraram em ratas hipotireoideas a ocorrência de hidrossalpinge, embora os mecanismos dessa alteração nesta disfunção endócrina sejam desconhecidos.

Sabe-se que a morfologia do epitélio tubário e o material liberado pelas células secretoras sofrem modificações nos diferentes segmentos da tuba uterina (LEE; SUGIMURA; KUDO, 1976), sendo essas alterações resultantes principalmente das variações cíclicas dos esteroides sexuais, principalmente do estrógeno e da progesterona (OKADA *et al.*, 2003). O estrógeno estimula a secreção celular e a motilidade tubária (CRETOIU; LAURA SUCIU; POPESCU, 2010; JACQUES DONNEZ *et al.*, 1985; OKADA *et al.*, 2003). Winuthayanon *et al.* (2015) demonstrou que a deleção do receptor de estrógeno alfa (ER α) em oviduto de camundongos, estava relacionado a problemas na fertilização, resultantes da redução da

concentração de quimiocinas no fluido tubário que sugestivamente reduziu a migração espermática, além do aumento da atividade de proteases que levavam a degradação da zona pelúcida e lise embrionária.

Já o excesso de progesterona está relacionado a redução do batimento ciliar das células tubárias em humanos e roedores, enquanto o uso de um antagonista do receptor de progesterona, a mifepristona (RU486) em camundongos causou também prejuízos no transporte de gametas (BYLANDER *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015) e na motilidade ovidutal (CRETOIU; LAURA SUCIU; POPESCU, 2010). O estrógeno e a progesterona também regulam a expressão de moduladores da função tubária como endotelina-3 (AKISON *et al.*, 2014), proteína 1 relacionada a Ras (JEONG *et al.*, 2018), aquaporina-5 (BRAÑES *et al.*, 2005), cicloxigenase-2 (COX-2) (PÉREZ MARTÍNEZ *et al.*, 2006), sendo que alterações na expressão destes moduladores podem comprometer o sucesso reprodutivo (AL-ALEM *et al.*, 2007; BRAÑES *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2018).

Estudos com ratas hipotireoideas demonstraram redução dos níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona no proestro e estro, respectivamente (dados não publicados), enquanto há um aumento de progesterona no diestro (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a). Além disso, ratas hipotireoideas em diestro apresentam redução na altura das vilosidades do infundíbulo, e no número e tamanho das células que revestem as vilosidades, reduzindo significativamente a altura epitelial desse segmento (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Alterações semelhantes foram também demonstradas por (ANAYA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2015) em coelhas hipotireoideas, além de alterações no conteúdo do fluido tubário (MÉNDEZ-TEPEPA *et al.*, 2020). Contudo, os mecanismos pelos quais o hipotireoidismo causa essas alterações são desconhecidos. Vale ressaltar que essas alterações na morfologia e secreção tubária podem comprometer a fertilização e nutrição embrionária, podendo estar relacionada a infertilidade observada em quadros de hipotireoidismo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a).

No entanto, a tuba uterina também expressa kisspeptina (GAYTÁN *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2014), principalmente no proestro/estro, sugerindo a sua participação no processo de fertilização (HSU *et al.*, 2014). A kisspeptina é considerada um peptídeo chave para a reprodução, pois sua expressão central estimula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (DE ROUX *et al.*, 2003; OHTAKI *et al.*, 2001), enquanto sua expressão periférica é importante para implantação embrionária e função placentária (SCHAEFER *et al.*, 2021). Estudos recentes em ratas têm demonstrado que o hipotireoidismo reduz a expressão de kisspeptina no hipotálamo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022b), na placenta (SANTOS *et al.*, 2022)

e no útero na fase de implantação (dados não publicados), embora não tenha estudos sobre a sua expressão na tuba uterina.

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão de *kiss1*/*kiss1r* e dos receptores de esteroides sexuais na tuba uterina de ratas hipotireoideas ao longo do ciclo estral, como também a expressão de mediadores envolvidos no transporte, secreção e função tubária. Os achados demonstraram que o hipotireoidismo desregula a expressão de *ER α* e *Pr* na tuba uterina de ratas em proestro, e que essas alterações podem estar associadas ao aumento da expressão gênica de reguladores da função tubária, incluindo *Kiss1r*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Manejo animal e indução do hipotireoidismo

Ratas Wistar adultas oriundas do Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) foram selecionadas após a visualização de dois ciclos estrais completos. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (7 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e ração *ad libitum*. As ratas foram separadas, ao acaso, em dois grupos, hipotireoideo (n=21) e controle (n=21). O hipotireoidismo foi induzido com administração diária de 4 mg/Kg de 6-propyl-2-thiouracil (PTU), diluídos em 3 ml de água destilada, via sonda orogástrica (DE OLIVEIRA et al., 2022). Os animais do grupo controle receberam água destilada como placebo. O peso dos animais foi avaliado a cada três dias e citologias vaginais diárias foram realizadas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UESC (Protocolo n° 028/22).

5.2.2 Eutanásia e coleta de material

Com o uso de guilhotina, os animais foram eutanasiados entre o 14° e 16° dia do início do tratamento com PTU ou água nas fases de proestro (7 animais/grupo), estro (7 animais/grupo) ou diestro 1 (7 animais/grupo). As eutanásias foram realizadas às 10:00 horas, nos animais em diestro e estro, enquanto os animais em proestro foram eutanasiados às 18:00 horas, período que corresponde ao pico de LH (CASTELLANO et al., 2006). Nas eutanásias foram coletados o sangue e as tubas uterinas. O sangue foi colocado em tubos falcons com heparina, centrifugado para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20°C para dosagens hormonais e de T4 livre para confirmação da indução da disfunção tireoidiana.

Uma das tubas uterinas foi colocada em criotubos com Trizol, congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para avaliação da expressão gênica. A outra tuba uterina foi fixada em paraformaldeído 4% durante 20 horas e posteriormente foi processada pela técnica de inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicas de 4 μm em lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat, Germany) para imuno-histoquímica, e em lâminas histológicas para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e realização da histomorfometria.

5.2.3 Análise hormonal

O plasma foi obtido após centrifugação do sangue a 3000 rpm por 20 min e armazenado a -20°C para dosagem de E2, P4, LH e T4 livre. Os níveis plasmáticos de E2 e P4 foram avaliados usando o kit DRG (E2 Elisa, EIA-2693, DRG Instruments GmbH, Hamburgo, Alemanha) e kit de progesterona de rato (P4 Elisa, RTC008R, Biovendor Research and Diagnostics Products, Brno, República Tcheca), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de LH foram avaliados por ELISA ultrasensível, conforme descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2020). A dosagem de T4 Livre foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante (T4 Livre, IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA; Sensibilidade: 0,04 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022a). Para cada ELISA todas as amostras foram analisadas em um único ensaio.

5.2.4 Imuno-histoquímica

Secções histológicas da tuba uterina foram submetidas à análise imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-PR (sc-130071; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA), anti-ER α (6f11; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), anti-KISS-1 (sc-101246; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA), anti-KISS1R (HPA071913, Sigma-Aldrich, Missouri, USA), e anti-MCM2/CDC-47 (sc-373702; Santa Cruz Biotechnology. CA, USA).

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (NOVOLINK-POLYMER-DETECTION-SYSTEMS, Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). A recuperação antigênica foi realizada por 20 minutos usando uma solução de ácido cítrico (0,54 mol/L; pH 6; 98°C). As lâminas foram incubadas por 42 horas com o anticorpo primário em câmara úmida e nas etapas de bloqueio de peroxidase endógena, soro bloqueio e estreptavidina peroxidase por 30 minutos em cada etapa. A incubação com o anticorpo secundário foi realizada por 45 min. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB) (DAB substrate system, Lab Vision

Corp., Fremont, CA, EUA). Por fim, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por solução de fosfato tamponada (PBS) (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b).

Foi realizada uma avaliação descritiva da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* e *Kiss1r* e uma avaliação quantitativa da expressão de $ER\alpha$, PR e CDC-47 na tuba uterina. Para as avaliações foram utilizadas 6 secções histológicas/grupo, sendo que para $ER\alpha$, PR e CDC-47 foi avaliada a porcentagem de células imunomarcadas, considerando 100 células do epitélio luminal e 100 células da musculatura lisa.

5.2.5 qPCR tempo real

Foi utilizado o Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Technologies, Carlsbad, CA, USA) para a extração do RNA total. Para as reações de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA e o kit comercial GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo foram quantificados pela qPCR utilizando SYBR Green no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Para as reações, foi utilizado 1,5 µL de cDNA, 100 nM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 µL de reação. Como controle negativo utilizou-se o mix de amplificação de DNA, no qual a amostra de cDNA foi substituída por água.

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. Para avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação da qPCR, curvas padrões de todos os transcritos foram geradas utilizando diluições seriadas do cDNA, além da avaliação da curva de melting dos produtos da amplificação. Os iniciadores para *Kiss1*, *Kiss1r*, *Et-1*, *Amigo2*, *Rasd1*, *Aqp5*, *Fetub*, *Esr1*, *PR* e *Gapdh* foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de *Gapdh* de *Rattus norvegicus* (HIRATE *et al.*, 2016; HSU *et al.*, 2014; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014b).

Tabela 2. Lista de genes e iniciadores para qPCR em tempo real na tuba uterina.

Gene	Iniciadores	Nº de acesso
<i>Kiss1r</i>	F: CAACCTGCTGGCCCTATACC R: TGCAGGGCGCCATCAGT	NM_023992.2
<i>Kiss1</i>	F: GAGCCACTGGCAAAAATGGC R: ATTAACGAGTTCCTGGGGTCC	NM_181692.1
<i>Edn1</i>	F: TTTGAAGACCGCGCTGAGAT R: TGCAAAACGAAGAGGACGGT	<u>NM_012548.2</u>
<i>Amigo2</i>	F: CGGCTGGCTAAGTATTTCCGT R: AGGGTGCATTCTGCCTTAACT	<u>NM_182816.3</u>
<i>Rasd1</i>	F: TGCAGCCCTCTACCTTCTCT R: TCGCTTGGGCACATCTTCTT	<u>XM_008767871.3</u>
<i>Aqp5</i>	F: CCACCCTCATCTTCGTCTTCTTT R: GAGATTTGCAGAATGGTGGGCA	<u>NM_012779.2</u>
<i>Fetub</i>	F: CCTCAGGACCTGGTACTTCAA R: CAAGATTGGCTTGAGCCGTTT	<u>NM_053348.2</u>
<i>Esr1</i>	F: GCCACTCGATCATTTCGAGCA R: CCTGCTGGTTCAAAAGCGTC	<u>NM_012689.1</u>
<i>Pgr</i>	F: CTTCCCAGACTGCACCTACC R: AGGCTGGAATTCGCCGTAATA	<u>NM_022847.2</u>
<i>Gapdh</i>	F: ACAGCCGCATCTTCTTGATGC R: GCCTCACCCCATTTGATGTT	NM_017008.4

5.2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm SEM. Realizou-se o teste *t* de Student não-pareado para comparações entre dois grupos, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2®. As análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 O hipotireoidismo altera o perfil plasmático de LH, E₂ e P₄ em ratas ao longo do ciclo estral

A confirmação da indução do hipotireoidismo pela administração de PTU foi estabelecida por meio da dosagem de T4 livre, mostrando uma redução significativa em seus níveis plasmáticos em comparação ao grupo controle (Tabela 1). A partir desse ponto, buscou-se investigar os níveis hormonais, analisando os valores de LH, E₂ e P₄. Observou-se nos animais hipotireoideos uma redução nos níveis plasmáticos de LH na tarde do proestro em relação ao controle (Tabela 1). Em relação a dosagem de E₂, o hipotireoidismo causou também uma redução da concentração no proestro em relação ao controle (Tabela 1). Na dosagem de

P₄, houve uma diminuição nos níveis durante o estro nos animais hipotireoideos e um aumento durante o diestro em comparação com o controle (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração plasmática de tiroxina (T₄) livre, esteroides sexuais e hormônio luteinizante (LH) nos grupos controle e hipotireoideo nas fases do ciclo estral.

Parâmetro	Controle Proestro	Hipotireoideo Proestro	Controle Estro	Hipotireoideo Estro	Controle Diestro	Hipotireoideo Diestro
T4 Livre (µg/dl)	2,34±0,14	0,42±0,064 ^{aaaa}	2,35±0,53	0,23±0,024 ^{bb}	1,80±0,02	0,15±0,02 ^{cccc}
Estrógeno (ng/dl)	230,6±26,01	60,64±11,14 ^{aa}	41,38±14,27	63,94±7,78	37,82±9,90	46,85±13,93
Progesterona (ng/dl)	49,52±2,79	30,18±6,187	7,66±1,39	1,55±0,59 ^{bbb}	19,31±2,68	41,76±6,69 ^c
LH (ng/dl)	13,46 ±1,43	4,02±1,76 ^{aaa}	0,57±0,12	1,55±0,59	0,53±0,12	0,60±0,086

Legenda: a=Vs Controle proestro, aaa= $p < 0,0001$, aa= $p < 0,001$, aa= $p < 0,01$. b=Vs Controle estro, bbb= $p < 0,001$, bb= $p < 0,01$. C=Vs Controle diestro, cccc= $p < 0,0001$, c= $p < 0,05$.

5.3.2 O hipotireoidismo reduz a expressão citoplasmática de ER α na tuba uterina de ratas em proestro e aumenta a expressão gênica de *Pgr*

Considerando que o hipotireoidismo causou alterações nos níveis dos esteroides sexuais e estudos prévios demonstraram que esses hormônios influenciam diversas funções tubárias (BYLANDER *et al.*, 2013; WINUTHAYANON *et al.*, 2015), avaliamos a expressão proteica e gênica de ER α e PR na tuba uterina dos animais. Ambos os marcadores revelaram uma imunomarcção que variava de fraca à moderada, presente em células epiteliais, estromais e musculares em todas as fases estrais avaliadas. Embora não tenha sido observada diferença significativa na porcentagem de células imunomarcadas para ER α no epitélio luminal e nem na expressão gênica de *Era* entre os grupos (Figura 7B-C), o hipotireoidismo causou uma redução intensa na marcação citoplasmática de ER α no proestro comparado ao controle, enquanto do estro teve um discreto aumento na expressão citoplasmática nos animais hipotireoideos (Figura 7A). Em relação a expressão de PR, também não foi observada diferença significativa na porcentagem de células epiteliais entre os grupos (Figura 7D-E). Contudo, na análise dos transcritos gênicos de *Pgr*, o hipotireoidismo causou um aumento na tuba uterina no proestro comparado ao controle (Figura 7F; $P < 0,01$), enquanto não teve diferença significativa nas outras fases do ciclo ($P > 0,05$).

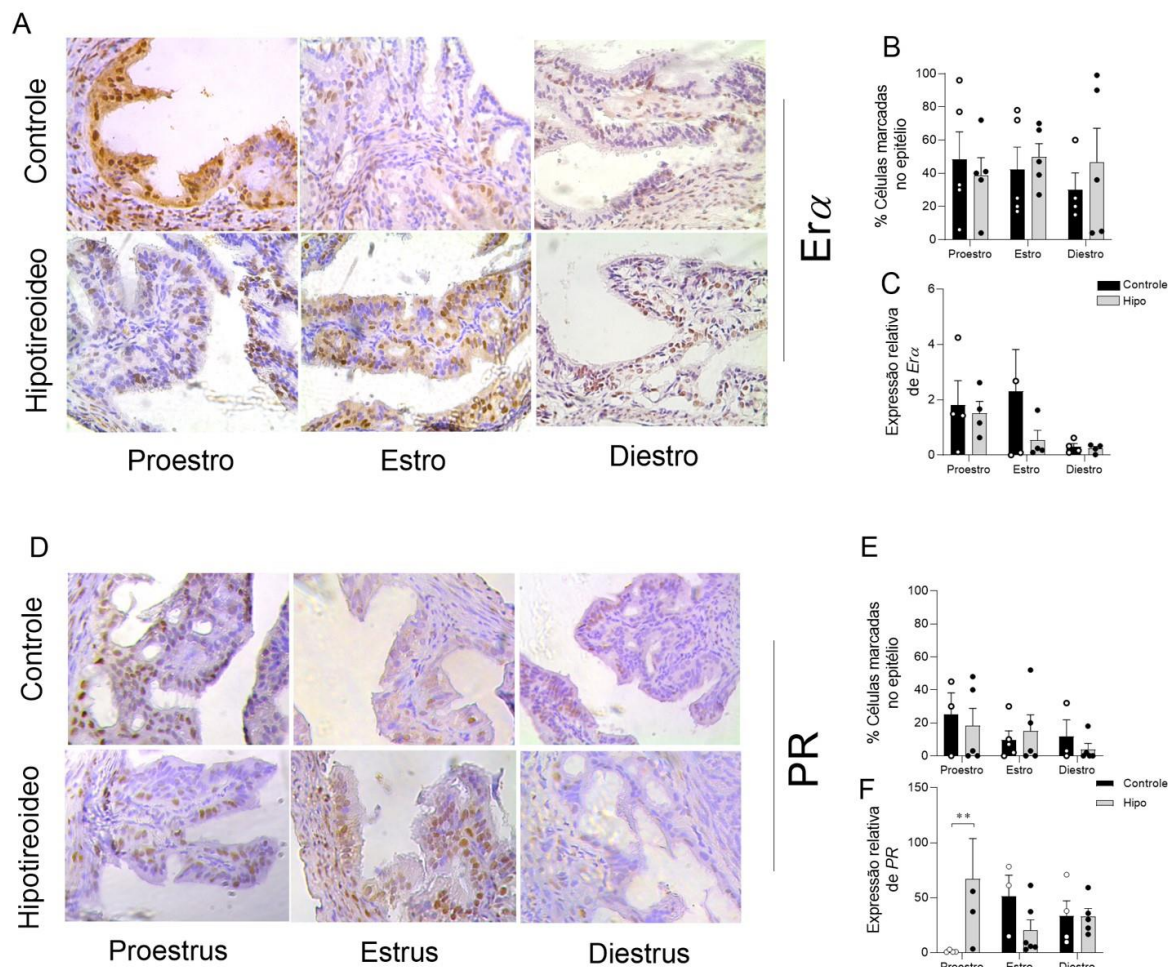


Figura 7. Expressão de ER α e PR na tuba uterina de ratas hipotireóideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de ER α (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Porcentagem de células marcadas para ER α no epitélio do infundíbulo/ampola da tuba uterina. C) Expressão gênica relativa do *Era*. D) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de PR (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). E) Porcentagem de células marcadas para PR no epitélio do infundíbulo/ampola da tuba uterina. F) Expressão gênica relativa do *Pr*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, **P < 0,01.

5.3.3 O hipotireoidismo aumenta a expressão gênica de *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1* e *Fetub* na tuba uterina de ratas em proestro

Uma vez que o hipotireoidismo desregulou a expressão tubária de ER α e *Pr* nas ratas em proestro, foi avaliada a expressão tubária de genes responsivos a P₄ e ao E₂ e que estão envolvidos na funcionalidade da tuba uterina. Interessantemente, hipotireoidismo aumentou acentuadamente a expressão dos transcritos gênicos de *Et-1* (Figura 8A; ****P < 0,0001), *Amigo2* (Figura 8A; *P < 0,05), *Aqp5* (Figura 8A; ****P < 0,0001), *Rasd1* (Figura 8A; **P < 0,01) e *Fetub* (Figura 8A; *P < 0,05) na fase de proestro quando comparado ao controle. Para

Aqp5, também foi observada uma tendência de aumento no estro nos animais hipotireoideos comparado ao controle (Figura 8C; $P = 0,054$). Nas outras fases do ciclo estral não foram observadas diferença significativa entre os grupos (Figura 8A-E; $P > 0,05$).

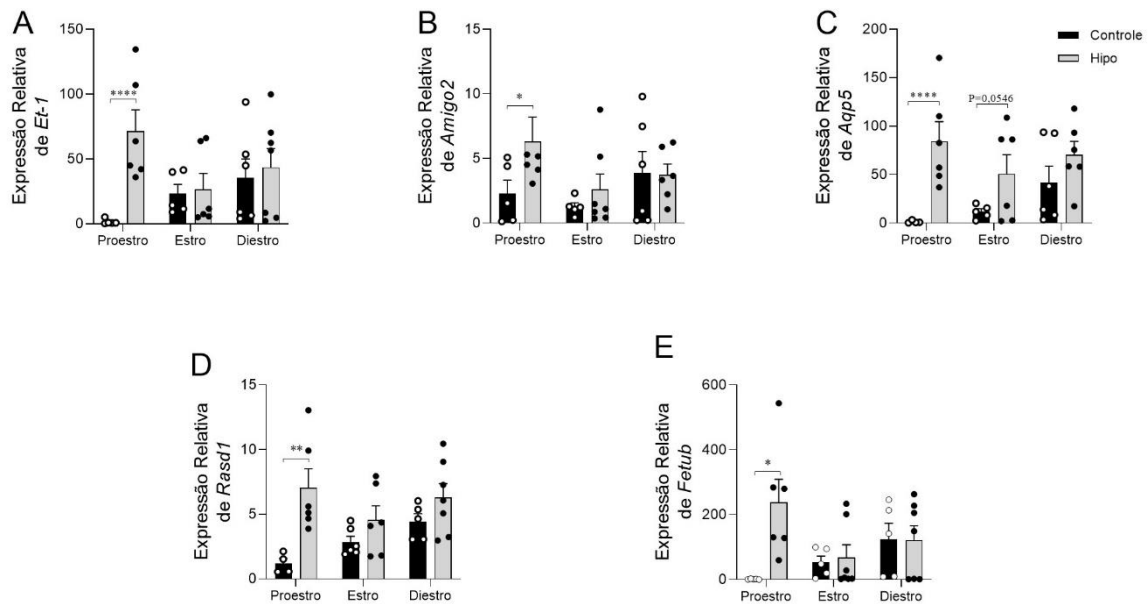


Figura 8. Expressão gênica de *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1* e *Fetub* na tuba uterina de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Expressão gênica relativa de *Et-1*; B) Expressão gênica relativa de *Amigo2*; C) Expressão gênica relativa de *Aqp5*; D) Expressão gênica relativa de *Rasd1*; E) Expressão gênica relativa de *Fetub*. As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

5.3.4 O hipotireoidismo altera a expressão gênica de *Kiss1r* na tuba uterina de ratas ao longo do ciclo estral

Considerando que o sistema kiss/kiss1r é expresso na tuba uterina (GAYTÁN *et al.*, 2007) e estudos demonstraram que a sua expressão no útero é também influenciada pelos esteroides sexuais (ZHANG *et al.*, 2014; SCHAEFER *et al.*, 2021), avaliamos a expressão gênica e proteica de Kiss e Kiss1r na tuba uterina dos animais. A imunomarcagem de Kiss1 (Figura 9 A), independente da fase do ciclo e do grupo experimental, foi discreta, citoplasmática e principalmente na porção apical do epitélio, com raras células estromais e musculares marcadas. Observou-se ainda a marcação em endotélio vascular. Já a imunomarcagem de Kiss1R ocorreu somente no endotélio dos vasos sanguíneos, não sendo observada em células epiteliais, estromais ou musculares. Na avaliação dos transcritos gênicos tanto de *Kiss1* (Figura 9B), não foi observada diferença significativa entre os grupos em nenhuma das fases estrais. Já em

relação a *Kiss1r*, semelhante aos genes responsivos à P_4 e ao E_2 , foi observada um aumento significativo no proestro nos animais hipotireoideos comparado ao controle (Figura 9C; $P < 0,05$), enquanto nas outras fases do ciclo não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$).

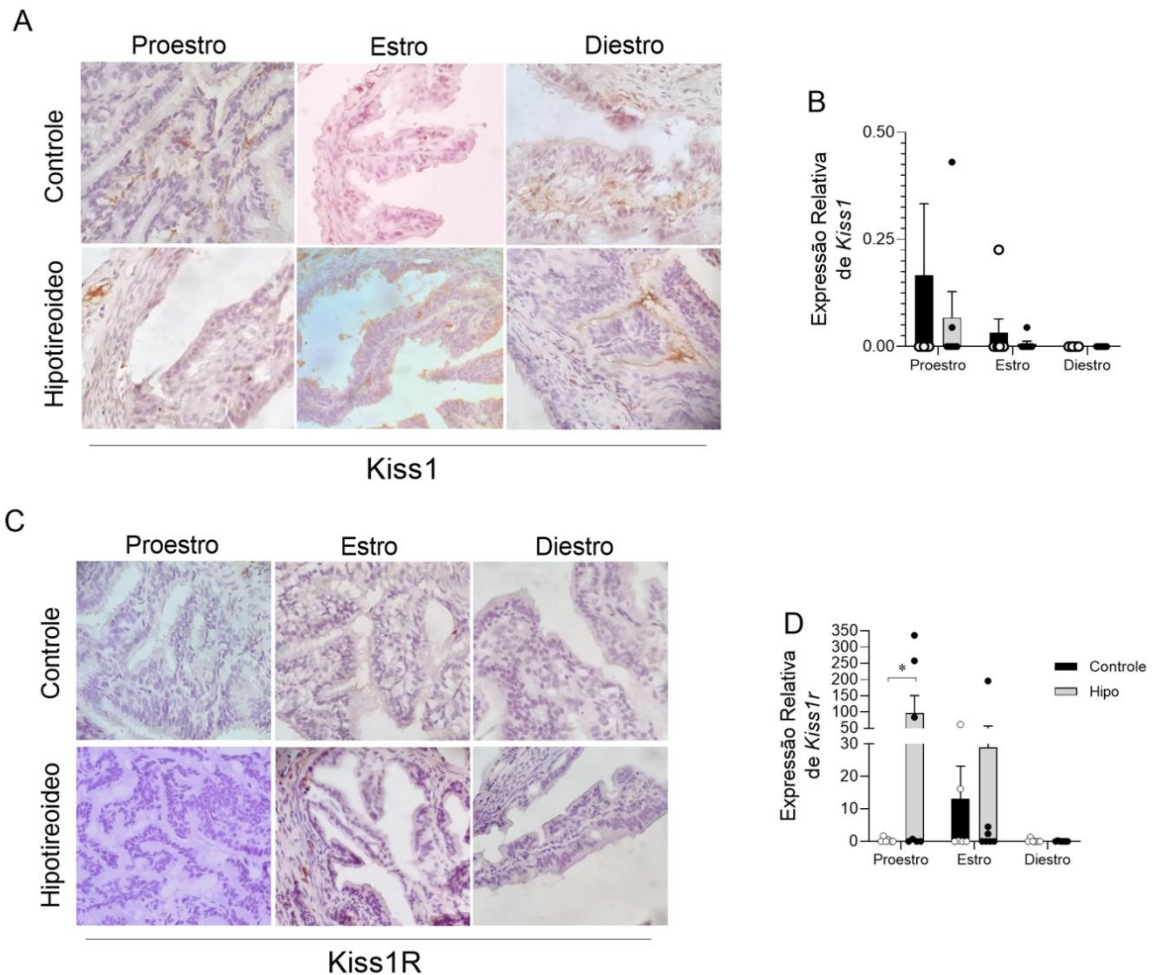


Figura 9. Expressão de *Kiss1* e *Kiss1r* na tuba uterina de ratas hipotireoideas durante o ciclo estral. A) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1* (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). B) Expressão gênica relativa de *Kiss1*; C) Fotomicrografias da expressão imuno-histoquímica de *Kiss1*(Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Bar = 50 μ m). D) Expressão gênica relativa de *Kiss1r*: As diferenças significativas foram determinadas por teste t de Student, * $P < 0,05$.

5.4 Discussão

Sabe-se que os esteroides sexuais desempenham inúmeras funções na tuba uterina (BYLANDER *et al.*, 2013; CROXATTO; ORTIZ, 1975; WINUTHAYANON *et al.*, 2015) e estudos sugerem que a sinalização destes hormônios pode estar prejudicada em endocrinopatias, como o hipotireoidismo (HAPON *et al.*, 2003; MATTHEIJ *et al.*, 1995). No entanto, ainda não há informações a respeito da função tubária nessa doença. Este estudo

demonstrou pela primeira vez que o hipotireoidismo altera a sinalização estrogênica e progesterônica na tuba uterina de ratas, particularmente no proestro, e essa alteração está associada a mudanças na expressão gênica de moduladores da função tubária (*Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1*, *Fetub*), como também de *Kiss1r*.

O hipotireoidismo em ratas reduziu os níveis plasmáticos de E₂ e LH durante o proestro, enquanto aumentou os níveis de P₄ no diestro. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram alterações nos níveis de LH (HATSUTA *et al.*, 2004), E₂ e P₄ (KOWALCZYK-ZIEBA *et al.*, 2021) em ratas com hipotireoidismo. Sugere-se que essas alterações sejam resultantes do quadro de hiperprolactinemia observadas nesses animais (TOHEI *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022), uma vez que a prolactina é um hormônio luteotrópico, estimulando a síntese luteal de progesterona (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975), enquanto em níveis suprafisiológicos inibe a secreção de LH (GRATTAN *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo demonstraram imunomarcagem de ER α e PR nas células epiteliais luminais, estromais e musculares do infundíbulo e ampola de ratas, sendo que o hipotireoidismo causou uma intensa redução da marcação citoplasmática epitelial de ER α no proestro, enquanto na mesma fase do ciclo teve aumento da expressão gênica tubária de *Pr*. Esse perfil de expressão foi semelhante ao observado por Queiroz *et al.* (2024; dados não publicados) no útero de animais hipotireoideos. Essa expressão citoplasmática epitelial reduzida de ER α nas ratas hipotireoideas em proestro sugere redução da sinalização estrogênica e, conseqüentemente, redução da ativação de vias citoplasmáticas moduladas pelo E₂, como a do fosfatidilinositol-3-quinase (MORIYAMA *et al.*, 2020; RAZANDI *et al.*, 1999). Por outro lado, o aumento da expressão gênica de *Pgr* na mesma fase do ciclo pode ser reflexo da redução dos níveis plasmáticos de P₄ observado nesses animais no proestro e estro, uma vez que P₄ regula negativamente a expressão de seus receptores (TIBBETTS *et al.*, 1998).

Interessantemente, a maior expressão gênica tubária de *Pr* causada pelo hipotireoidismo no proestro foi acompanhada do aumento da expressão de transcritos reguladores da função tubária, como *Et-1*, *Amigo2*, *Aqp5*, *Rasd1* e *Fetub*, e que são regulados pelos esteroides sexuais. *Amigo2* está associado à adesividade celular e formação de matriz extracelular, sendo que células trofoblásticas humanas com deficiência neste gene apresentam redução da capacidade invasiva e da formação de vasos (YI *et al.*, 2021). Já a endotelina 1 (*Et-1*) estimula a contração da tuba uterina ao estimular a secreção de PGE₂ e PGF₂ pelas células epiteliais tubárias (WIJAYAGUNAWARDANE *et al.*, 2001). *Rasd 1*, por sua vez, está envolvido na proliferação e diferenciação celular (JEONG *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2017), sendo que no útero ele é

expressão principalmente no proestro (KIM *et al.*, 2017) e redução da sua expressão foi observada no endométrio de mulheres com falha de implantação recorrente (CHOI *et al.*, 2016). Já a glicoproteína Fetuina B (*Fetub*) retarda o endurecimento da zona pelúcida do oócito por inibir a ação da ovastina (DIETZEL *et al.*, 2013). Curiosamente, mulheres com tireoidite autoimune apresentam baixos níveis de Fetuin-b plasmática (ZHANG *et al.*, 2022), ao contrário do que foi observado na expressão gênica tubária em nosso estudo.

A aquaporina 5 (*Aqp5*) é necessária para a produção de fluido luminal (SCHAEFER *et al.*, 2021), bem como na contração tubária (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; SERES-BOKOR *et al.*, 2021). Estudos prévios indicaram que o tratamento com progesterona ou a combinação de progesterona e estrógeno aumenta a expressão de *Aqp5* no útero de ratas (LINDSAY; MURPHY, 2006), corroborando os resultados do presente estudo, uma vez que teve aumento da expressão gênica de *Pr*. É plausível que o aumento tubário de *Aqp5* observado nos animais do presente estudo esteja envolvido na ocorrência de hidrossalpinge em ratas hipotireoideas descrito por Mittag *et al.* (2007), uma vez que essa doença é caracterizada pelo acúmulo de líquido no interior da tuba uterina e isso pode comprometer a taxa de fertilização e, conseqüentemente, a taxa implantacional (CHIEN *et al.*, 2002), como já foi observado em mulheres (ZEYNELOGLU; ARICI; OLIVE, 1998). Vale ressaltar que o aumento da sinalização progesterônica devido ao aumento de *Pr* também pode comprometer o transporte do óvulo, pois a P_4 bloqueia o seu transporte na tuba uterina (FUENTEALBA; NIETO; CROXATTO., 1988). Um estudo usando o antagonista do receptor de progesterona (RU486) em ratas demonstrou que os embriões chegavam onze horas mais cedo no útero (FUENTEALBA; NIETO; CROXATTO., 1987). Assim, podemos sugerir que a maior expressão gênica tubária de *Pr* nas ratas hipotireoideas pode também estar envolvida na menor taxa de implantação observada nessa endocrinopatia (SHAN *et al.*, 2019), uma vez que pode ter retardado o transporte do óvulo e/ou embrião.

Nossos resultados demonstraram que a expressão tubária de *Kiss1r* também aumentou nas ratas hipotireoideas na fase de proestro. É plausível que este aumento esteja associado a redução da expressão citoplasmática de $ER\alpha$ observada nesses animais, pois SCHAEFER *et al.* (2021) demonstraram uma regulação negativa entre *Kiss1R* e $ER\alpha$. Camundongos nocautes pra *Kiss1r* apresentam hiperexpressão e maior atividade transcricional de $ER\alpha$ no útero (SCHAEFER *et al.* (2021). Além disso, embora o hipotireodismo não tenha alterado a expressão gênica e proteica de *Kiss1*, nos resultados de expressão gênica estão de acordo com GAYTÁN

et al. (2007) que também demonstraram em ratas maior expressão gênica tubária de *Kiss1* no proestro.

Os resultados deste estudo demonstraram que o hipotireoidismo altera a sinalização de ER α e PR na tuba uterina de ratas em proestro, com aumento da expressão de moduladores da função tubária nessa fase do ciclo, inclusive de *Kiss1r*. Essas alterações podem afetar a fertilização e devem estar envolvidas na redução da taxa de implantação observada em ratas com hipotireodismo.

REFERÊNCIAS

- ABALOVICH, M.; MITELBERG, L.; ALLAMI, C.; GUTIERREZ, S.; ALCARAZ, G.; OTERO, P.; LEVALLE, O. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. **Gynecological Endocrinology**, v. 23, n. 5, p. 279–283, 7 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09513590701259542>>.
- ABDELKAREEM, A. O.; IEWS, M. S.; AIT-ALLAH, A. S.; RASHEED, S. M.; HELMY, Y. A.; HABTE, R.; ABDELHAFEZ, F. F.; BEDAIWY, M. A. Immunohistochemistry of Leukemia Inhibitory Factor and Integrin $\alpha V\beta 3$ in Mouse Endometrium Following Kisspeptin-54 Ovulation Trigger. **Reproductive Sciences**, n. 0123456789, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43032-023-01243-7>>.
- ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: Regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. **Histology and Histopathology**, v. 11, n. 3, p. 743–768, 1996.
- AJAYI, A. F.; AKHIGBE, R. E. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertility Research and Practice**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2020.
- AKAD, M. Kisspeptin Serum Levels in Patients with Endometriosis, New Research Pathways Regarding Female Infertility. **Maedica - A Journal of Clinical Medicine**, v. 17, n. 3, p. 557–560, 2022.
- AKISON, L. K.; BODEN, M. J.; KENNAWAY, D. J.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Progesterone receptor-dependent regulation of genes in the oviducts of female mice. **Physiological Genomics**, v. 46, n. 16, p. 583–592, 2014.
- AL-ALEM, L.; BRIDGES, P. J.; SU, W.; GONG, M. C.; IGLARZ, M.; KO, C. M. Endothelin-2 induces oviductal contraction via endothelin receptor subtype A in rats. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 3, p. 383–391, 2007.
- AL-AZEMI, M.; REFAAT, B.; APLIN, J.; LEDGER, W. The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. **Human Reproduction**, v. 24, n. 10, p. 2582–2587, 2009.
- AL SUBHI, T.; AL JASHNMI, R. N.; AL KHADURI, M.; GOWRI, V. Prevalence of tubal obstruction in the hysterosalpingogram of women with primary and secondary infertility. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 14, n. 4, p. 214–216, 2013.
- ANAYA-HERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-CASTELÁN, J.; NICOLÁS, L.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.; JIMÉNEZ-ESTRADA, I.; CASTELÁN, F.; CUEVAS, E. Hypothyroidism affects differentially the cell size of epithelial cells among oviductal regions of rabbits. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 1, p. 104–111, 2015.
- ARAUJO-LOPES, R.; CRAMPTON, J. R.; AQUINO, N. S. S.; MIRANDA, R. M.; KOKAY, I. C.; REIS, A. M.; FRANCI, C. R.; GRATTAN, D. R.; SZAWKA, R. E. Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 1010–1020, 2014.
- ATTAR, E. Endocrinology of ectopic pregnancy. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 31, n. 4, p. 779–794, 2004.
- BAARENDS, W. M.; JOS W. HOOGERBRUGGE, A. P. N. T.; UILENBROEK, J. T. J.; KRAMER, P.; ELISABETH; C. M. VAN LEEUWEN, A.; GROOTEGOED, J. A. Anti-Müllerian Hormone and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovaries during Postnatal Development, the Estrous Cycle, and Gonadotropin-Induced Follicle Growth. 1995.

- BABA, T.; SOOK, H.; YUKO, K.; BUDIMAN, H.; KAORU, K. Menstrual cyclic change of metastin / GPR54 in endometrium. **Medical Molecular Morphology**, p. 76–84, 2015.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00795-014-0081-0>>.
- BARBANEL, G.; ASSENMACHER, I. EFFECTS OF THYROID HORMONES ON THE ONTOGENY OF OESTRADIOL BINDING SITES IN THE RAT. v. 28, 1982.
- BRAÑES, M. C.; MORALES, B.; RÍOS, M.; VILLALÓN, M. J. Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 288, n. 5 57-5, p. 1048–1057, 2005.
- BUTCHER, R. L.; COLLINS, W. E.; FUGO, N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. **Endocrinology**, v. 94, n. 6, p. 1704–1708, 1974.
- BYLANDER, A.; LIND, K.; GOKSÖR, M.; BILLIG, H.; LARSSON, D. G. J. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. p. 1–9, 2013.
- CALDER, M.; CHAN, Y. M.; RAJ, R.; PAMPILLO, M.; ELBERT, A.; NOONAN, M.; GILLIO-MEINA, C.; CALIGIONI, C.; BÉRUBÉ, N. G.; BHATTACHARYA, M.; WATSON, A. J.; SEMINARA, S. B.; BABWAH, A. V. Implantation failure in female Kiss1-/- mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3065–3078, 2014a.
- CALDER, M.; CHAN, Y. M.; RAJ, R.; PAMPILLO, M.; ELBERT, A.; NOONAN, M.; GILLIO-MEINA, C.; CALIGIONI, C.; BÉRUBÉ, N. G.; BHATTACHARYA, M.; WATSON, A. J.; SEMINARA, S. B.; BABWAH, A. V. Implantation failure in female Kiss1-/- mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3065–3078, 2014b.
- CALIGIONI, C. Assessing Reproductive Status/Stages in Mice Claudia. **Current Protocols in Neuroscience**, p. 1–11, 2010.
- CAO, Y.; LI, Z.; JIANG, W.; LING, Y.; KUANG, H. **Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery** **Reproductive Biology and Endocrinology** BioMed Central Ltd., 9 ago. 2019.
- CASTELLANO, J. M.; GAYTAN, M.; ROA, J.; VIGO, E.; NAVARRO, V. M.; BELLIDO, C.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; PELLICER, A.; PINILLA, L.; GAYTAN, F.; TENA-SEMPERE, M. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852–4862, 2006.
- CEJUDO ROMAN, A.; PINTO, F. M.; DORTA, I.; ALMEIDA, T. A.; HERNÁNDEZ, M.; ILLANES, M.; TENA-SEMPERE, M.; CANDENAS, L. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 5, p. 1213–1219, maio 2012.
- CHAUHAN, M.; BALAKRISHNAN, M.; CHAN, R.; YALLAMPALLI, C. Adrenomedullin 2 (ADM2) regulates mucin 1 at the maternal-Fetal interface in human pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 6, p. 1–8, 2015.
- CHEN, M.; WOLFE, A.; WANG, X.; CHANG, C.; YEH, S.; RADOVICK, S. Generation and characterization of a complete null estrogen receptor α mouse using Cre/LoxP technology. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 321, n. 1–2, p. 145–153, 2009.
- CHIEN, L. W.; AU, H. K.; XIAO, J.; TZENG, C. R. Fluid accumulation within the uterine cavity reduces pregnancy rates in women undergoing IVF. **Human Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 351–356, 2002.

- CHOI, Y.; KIM, H. R.; LIM, E. J.; PARK, M.; YOON, J. A.; KIM, Y. S.; KIM, E. K.; SHIN, J. E.; KIM, J. H.; KWON, H.; SONG, H.; CHOI, D. H. Integrative analyses of uterine transcriptome and microRNAome reveal compromised LIF-STAT3 signaling and progesterone response in the endometrium of patients with recurrent/repeated implantation failure (RIF). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–14, 2016.
- CIDLOWSKI, J. A.; MULDOON, T. G. Modulation by thyroid hormones of cytoplasmic estrogen receptor concentrations in reproductive tissues of the rat. **Endocrinology**, v. 97, n. 1, p. 59–67, 1975.
- CIELESH, M. E.; MCGRATH, B. M.; SCOTT, C. J.; NORMAN, S. T.; STEPHEN, C. P. The localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of the reproductive cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 24–28, 2017.
- CLARKSON, J.; BOON, W. C.; SIMPSON, E. R.; HERBISON, A. E. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. **Endocrinology**, v. 150, n. 7, p. 3214–3220, 2009.
- COOKE, P. S.; BUCHANAN, D. L.; YOUNG, P.; SETIAWAN, T.; BRODY, J.; KORACH, K. S.; TAYLOR, J.; LUBAHN, D. B.; CUNHA, G. R. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 12, p. 6535–6540, 1997.
- COOKE, P. S.; EKMAN, G. C.; KAUR, J.; DAVILA, J.; BAGCHI, I. C.; CLARK, S. G.; DZIUK, P. J.; HAYASHI, K.; BARTOL, F. F. Brief exposure to progesterone during a critical neonatal window prevents uterine gland formation in mice. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 1–10, 2012.
- CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015.
- CRETOIU, S. M.; LAURA SUCIU; POPESCU, L. M. Interstitial Cajal-like cells of human Fallopian tube express estrogen and progesterone receptors. n. 2009, p. 387–394, 2010.
- CROXATTO, H. B.; ORTIZ, M.-E. S. Egg transport in the fallopian tube. **Gyneco. invest**, 1975.
- DE OLIVEIRA, L. S.; DA SILVA, T. Q. M.; BARBOSA, E. M.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTOS, L. C.; HENRIQUES, P. C.; SANTOS, B. R.; GUSMÃO, D. O.; DE MACEDO, I. O.; SZAWKA, R. E.; SILVA, J. F. Kisspeptin treatment restores ovarian function in rats with hypothyroidism. **Thyroid**, 29 jun. 2022a.
- DE OLIVEIRA, L. S.; DA SILVA, T. Q. M.; BARBOSA, E. M. E.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTOS, L. C.; HENRIQUES, P. C.; SANTOS, B. R.; GUSMAO, D. D. O.; DE MACEDO, I. O.; SZAWKA, R. E.; SILVA, J. F. Kisspeptin Treatment Restores Ovarian Function in Rats with Hypothyroidism. **Thyroid**, v. 32, n. 12, p. 1568–1579, 2022b.
- DE OLIVEIRA, V.; SCHAEFER, J.; ABU-RAFEA, B.; VILOS, G. A.; VILOS, A. G.; BHATTACHARYA, M.; RADOVICK, S.; BABWAH, A. V. Uterine aquaporin expression is dynamically regulated by estradiol and progesterone and ovarian stimulation disrupts embryo implantation without affecting luminal closure. **Molecular Human Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 154–166, 2020.
- DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J. C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 2003.

DIAS, J. C. O.; VELOSO, C. M.; DONZELE, R. F. M. de O.; DE CARVALHO, G. R. **O neuropeptídeo kisspeptina e a reprodução animal: uma revisão** *Multi-Science Journal* 2018.

DIETZEL, E.; WESSLING, J.; FLOEHR, J.; SCHÄFER, C.; ENSSLEN, S.; DENECKE, B.; RÖSING, B.; NEULEN, J.; VEITINGER, T.; SPEHR, M.; TROPARTZ, T.; TOLBA, R.; RENNÉ, T.; EGERT, A.; SCHORLE, H.; GOTTENBUSCH, Y.; HILDEBRAND, A.; YIALLOUROS, I.; STÖCKER, W.; WEISKIRCHEN, R.; JAHNEN-DECHENT, W. Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Developmental Cell*, v. 25, n. 1, p. 106–112, 2013.

EKAMBARAM, G.; KUMAR, S. K. S.; JOSEPH, L. D. Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 1, p. AC05–AC07, 2017.

ELLINGTON, J. E.; IGNOTZ, G. G.; BALL, B. A.; MEYERS-WALLEN, V. N.; CURRIE, W. B. De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 48, n. 4, p. 851–856, 1993.

EVANS, R. W.; FARWELL, A. P.; BRAVERMAN, L. E. Nuclear thyroid hormone receptor in the rat uterus. *Endocrinology*, v. 113, n. 4, p. 1459–1463, 1983.

FAYAZI, M.; CALDER, M.; BHATTACHARYA, M.; VILOS, G. A.; POWER, S.; BABWAH, A. V. The pregnant mouse uterus exhibits a functional kisspeptin/KISS1R signaling system on the day of embryo implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12958-015-0105-1>>.

FERNANDOIS, D.; NA, E.; CUEVAS, F.; CRUZ, G.; LARA, H. E.; PAREDES, A. H. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *Journal of Endocrinology*, v. 228, n. 3, p. 161–170, 2016.

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

FINN, C. A.; MARTIN, L. The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse. *The Journal of endocrinology*, v. 47, n. 4, p. 431–438, 1970.

FRANCO, H. L.; DAI, D.; LEE, K. Y.; RUBEL, C. A.; ROOP, D.; BOERBOOM, D.; JEONG, J.; LYDON, J. P.; BAGCHI, I. C.; BAGCHI, M. K.; DEMAYO, F. J. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 4, p. 1176–1187, 2011.

FRANCO, H. L.; LEE, K. Y.; BROADDUS, R. R.; WHITE, L. D.; LANSKE, B.; LYDON, J. P.; JEONG, J. W.; DEMAYO, F. J. Ablation of Indian hedgehog in the murine uterus results in decreased cell cycle progression, aberrant epidermal growth factor signaling, and increased estrogen signaling. *Biology of Reproduction*, v. 82, n. 4, p. 783–790, 2010a.

FRANCO, H. L.; LEE, K. Y.; RUBEL, C. A.; CREIGHTON, C. J.; WHITE, L. D.; BROADDUS, R. R.; LEWIS, M. T.; LYDON, J. P.; JEONG, J. W.; DEMAYO, F. J. Constitutive activation of smoothened leads to female infertility and altered uterine differentiation in the mouse. *Biology of Reproduction*, v. 82, n. 5, p. 991–999, 2010b.

FREEMAN, M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The Physiology of Reproduction*, p. 613–658, 1994.

FUENTEALBA, B.; NIETO, M.; CROXATTO, H. B. Ovum transport in pregnant rats is little affected by RU486 and exogenous progesterone as compared to cycling rats. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 768–774, 1987.

FUENTEALBA, B.; NIETO, M.; CROXATTO, H. B. Progesterone abbreviates the nuclear retention of estrogen receptor in the rat oviduct and counteracts estrogen action on egg transport. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 1, p. 63–69, 1988.

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, 2017.

GAYTAN, F.; GARCIA-GALIANO, D.; DORFMAN, M. D.; MANFREDI-LOZANO, M.; CASTELLANO, J. M.; DISSEN, G. A.; OJEDA, S. R.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 3088–3097, 2014.

GAYTÁN, F.; GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J. M.; ROMERO, M.; ROA, J.; APARICIO, B.; GARRIDO, N.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; MILLAR, R. P.; PELLICER, A.; FRASER, H. M.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, p. 520–531, 2009. Disponível em: <<http://www.ajpendo.org>>.

GAYTÁN, M.; CASTELLANO, J. M.; ROA, J.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; TENA-SEMPERE, M.; GAYTÁN, F. Expression of KiSS-1 in rat oviduct: Possible involvement in prevention of ectopic implantation? **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 571–579, 2007.

GELFANT, S.; MEYER, R. R.; HANS, R. I. S. Uterine growth following stimulation by estrogen and inhibition by aminopterin and nitrogen mustard. **Journal of Experimental Zoology**, v. 128, p. 219–257, 1955. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.1401280202>>.

GOLDMAN, J. M.; LAWS, S. C.; BALCHAK, S. K.; COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J. Endocrine-disrupting chemicals: Prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 135–196, 2000.

GOMES DE MACEDO BRAGA, L. M. Controle reprodutivo em biotérios de criação de animais de laboratório com ênfase em roedores. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 41, n. 1, p. 105–109, 2017. Disponível em: <www.cbra.org.br>.

GORSKA, P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. **Medical Science Monitor**, v. 6, n. 1, p. 171–180, 2000.

GRATTAN, D. R.; JASONI, C. L.; LIU, X.; ANDERSON, G. M.; HERBISON, A. E. Prolactin regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons to suppress luteinizing hormone secretion in mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4344–4351, 2007.

GRUNERT, G.; TCHERNITCHIN, A. N. Effect of progesterone on the non-genomic response to oestrogen in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 94, n. 3, p. 307–315, set. 1982. Disponível em: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/94/3/joe_94_3_001.xml>.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. . Anatomy of Female Reproduction. **Reproduction in Farm Animals**, p. 13–29, 2016.

HAN, S. J.; JEONG, J.; DEMAYO, F. J.; XU, J.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J.; O'MALLEY, B.

- W. Dynamic Cell Type Specificity of SRC-1 Coactivator in Modulating Uterine Progesterone Receptor Function in Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 18, p. 8150–8165, 2005.
- HAPON, M. B.; GAMARRA-LUQUES, C.; JAHN, G. A. Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. Igf I, p. 1–11, 2010.
- HAPON, M. B.; MOTTA, A. B.; EZQUER, Ma.; BONAFEDE, M.; JAHN, G. A. Hypothyroidism prolongs corpus luteum function in the pregnant rat. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 197–205, 2007.
- HAPON, M. B.; SIMONCINI, M.; VIA, G.; JAHN, G. A. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 371–382, 2003.
- HARPER, M. J. K. Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 369–377, 1973.
- HATSUTA, M.; ABE, K.; TAMURA, K.; RYUNO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.; KOGO, H. Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, n. 3, p. 343–348, 2004.
- HIDEN, U.; BILBAN, M.; KNÖFLER, M.; DESOYE, G. **Kisspeptins and the placenta: Regulation of trophoblast invasion** *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* mar. 2007.
- HIRATE, Y.; SUZUKI, H.; KAWASUMI, M.; TAKASE, H. M.; IGARASHI, H.; NAQUET, P.; KANAI, Y.; KANAI-AZUMA, M. Mouse Sox17 haploinsufficiency leads to female subfertility due to impaired implantation. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24171>>.
- HIROI, H.; INOUE, S.; WATANABE, T.; GOTO, W.; ORIMO, A.; MOMOEDA, M.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y.; MURAMATSU, M. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 37–44, 1999.
- HSU, M. C.; WANG, J. Y.; LEE, Y. J.; JONG, D. S.; TSUI, K. H.; CHIU, C. H. Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 835–845, 2014.
- HU, K. L.; CHANG, H. M.; ZHAO, H. C.; YU, Y.; LI, R.; QIAO, J. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 3, p. 326–343, 1 maio 2019.
- HU, K. L.; ZHAO, H.; CHANG, H. M.; YU, Y.; QIAO, J. **Kisspeptin/kisspeptin receptor system in the ovary** *Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., 4 jan. 2018.
- HUNTER, R. H. F. Modulation of Gamete and Embryonic Microenvironments by Oviduct Glycoproteins. v. 181, p. 176–181, 1994.
- HUNTER, R. H. F. The Fallopian tubes in domestic mammals: How vital is their physiological activity? **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 281–290, 2005.
- INUWA, I. M.; WILLIAMS, M. A. A morphometric study on the endometrium of rat uterus in hypothyroid and thyroxine treated hypothyroid rats. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 111, n. 2, p. 215–226, 2006.
- JACQUES DONNEZ, M. D.; FRAMÇOISE CASANAS-ROUX, B. S.; JACQUES CAPRASSE, M. D.; JACQUES FERIN, M. D.; KARL THOMAS, M. . Cyclic changes in

ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *v. 43, n. 4, 1985.*

JEONG, W.; BAE, H.; LIM, W.; BAZER, F. W.; SONG, G. RAS-related protein 1: An estrogen-responsive gene involved in development and molting-mediated regeneration of the female reproductive tract in chickens. **Animal**, *v. 12, n. 8, p. 1594–1601, 2018.*

JOHNSON, K. R.-T. and J. R. The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. **Methods in Molecular Biology**, *v. 3, n. May, p. 2–6, 2018.*

KAKITA-KOBAYASHI, M.; MURATA, H.; NISHIGAKI, A.; HASHIMOTO, Y.; KOMIYA, S.; TSUBOKURA, H.; KIDO, T.; KIDA, N.; TSUZUKI-NAKAO, T.; MATSUO, Y.; BONO, H.; HIROTA, K.; OKADA, H. Thyroid Hormone Facilitates in vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells via Thyroid Hormone Receptors. **Endocrinology**, *v. 161, n. 6, p. 1–16, 1 jun. 2020.* Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32242219/>>.

KELLEHER, A. M.; DEMAYO, F. J.; SPENCER, T. E. Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. **Endocrine Reviews**, *v. 40, n. 5, p. 1424–1445, 2019.*

KIM, H. R.; CHO, K. S.; KIM, E.; LEE, O. H.; YOON, H.; LEE, S.; MOON, S.; PARK, M.; HONG, K.; NA, Y.; SHIN, J. E.; KWON, H.; SONG, H.; CHOI, D. H.; CHOI, Y. Rapid expression of RASD1 is regulated by estrogen receptor-dependent intracellular signaling pathway in the mouse uterus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, *v. 446, p. 32–39, 2017.* Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.006>>.

KIRILOV, M.; CLARKSON, J.; LIU, X.; ROA, J.; CAMPOS, P.; PORTEOUS, R.; SCHÜTZ, G.; HERBISON, A. E. Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. **Nature Communications**, *v. 4, 2013.*

KIRKLAND, J. L.; GARDNER, R. M.; MUKKU, V. R.; AKHTAR, M.; STANCEL, G. M. Hormonal Control of Uterine Growth: The Effect of Hypothyroidism on Estrogen-Stimulated Cell Division. **Endocrinology**, *v. 108, n. 6, p. 2346–2351, 1981.*

KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERDE, A.; COMMUNI, D.; VANDERWINDEN, J. M.; LE POUL, E.; BRÉZILLON, S.; TYLDESLEY, R.; SUAREZ-HUERTA, N.; VANDEPUT, F.; BLANPAIN, C.; SCHIFFMANN, S. N.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. **Journal of Biological Chemistry**, *v. 276, n. 37, p. 34631–34636, 2001.*

KOWALCZYK-ZIEBA, I.; STASZKIEWICZ-CHODOR, J.; BORUSZEWSKA, D.; LUKASZUK, K.; JAWORSKA, J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. Hypothyroidism affects uterine function via the modulation of prostaglandin signaling. **Animals**, *v. 11, n. 9, 2021.*

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

LAOHARATCHATATHANIN, T.; TERASHIMA, R.; YONEZAWA, T.; KURUSU, S.; KAWAMINAMI, M. Augmentation of metastin/kisspeptin mRNA expression by the proestrous luteinizing hormone surge in granulosa cells of rats: Implications for luteinization. **Biology of Reproduction**, *v. 93, n. 1, p. 1–9, 2015a.*

LAOHARATCHATATHANIN, T.; TERASHIMA, R.; YONEZAWA, T.; KURUSU, S.; KAWAMINAMI, M. Augmentation of metastin/kisspeptin mRNA expression by the proestrous luteinizing hormone surge in granulosa cells of rats: Implications for luteinization. **Biology of Reproduction**, *v. 93, n. 1, 1 jul. 2015b.*

- LAVY, G.; DECHERNEY, A. H. The Hormonal Basis of Ectopic Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 1, p. 217–224, mar. 1987. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00003081-198703000-00029>>.
- LECHENE, C. P. Electron probe analysis of the elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. p. 431–434, 1976.
- LEE, J.-H.; SUGIMURA, M.; KUDO, N. SEGMENTATION OF RAT OVIDUCT. 1976.
- LEE, K. Y.; JEONG, J.-W.; WANG, J.; MA, L.; MARTIN, J. F.; TSAI, S. Y.; LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J. Bmp2 Is Critical for the Murine Uterine Decidual Response. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 15, p. 5468–5478, 2007.
- LEE, W. L.; LEE, F. K.; WANG, P. H. Kisspeptin in female reproduction. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 84, n. 6, p. 559–560, 2021.
- LEHMAN, M. N.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3479–3489, 2010.
- LEÓN, S.; FERNANDOIS, D.; SULL, A.; SULL, J.; CALDER, M.; HAYASHI, K.; BHATTACHARYA, M.; POWER, S.; VILOS, G. A.; VILOS, A. G.; TENA-SEMPERE, M.; BABWAH, A. V. Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting endometrial gland development and function. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–17, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep29073>>.
- LI, Q.; KANNAN, A.; DEMAYO, F. J.; LYDON, J. P.; COOKE, P. S.; YAMAGISHI, H.; SRIVASTAVA, D.; BAGCHI, M. K.; BAGCHI, I. C. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by hand2. **Science**, v. 331, n. 6019, p. 912–916, 2011.
- LI, Q.; KANNAN, A.; WANG, W.; DEMAYO, F. J.; TAYLOR, R. N.; BAGCHI, M. K.; BAGCHI, I. C. Bone morphogenetic protein 2 functions via a conserved signaling pathway involving Wnt4 to regulate uterine decidualization in the mouse and the human. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31725–31732, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704723200>>.
- LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 1, p. R1–R26, 2017.
- LIANG, X. H.; DENG, W. B.; LI, M.; ZHAO, Z. A.; WANG, T. S.; FENG, X. H.; CAO, Y. J.; DUAN, E. K.; YANG, Z. M. Egr1 protein acts downstream of estrogen-leukemia inhibitory factor (LIF)-STAT3 pathway and plays a role during implantation through targeting Wnt4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 34, p. 23534–23545, 2014.
- LINDSAY, L. A.; MURPHY, C. R. Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: A study with light and electron microscopy. **Reproduction**, v. 131, n. 2, p. 369–378, 2006.
- LJUNGKVIST, I. Quantitative studies of the effect of progesterone on endometrial morphology of the spayed rat. **Anatomy and Embryology**, v. 148, n. 1, p. 47–58, 1975.
- MALIK, M.; ROH, M.; ENGLAND, S. K. Uterine contractions in rodent models and humans. **Acta Physiologica**, v. 231, n. 4, p. 1–17, 2021.
- MARKEE, J. E. Physiology of reproduction. **Annual review of physiology**, v. 13, p. 367–396, 1951.
- MASSIMIANI, M.; LACCONI, V.; LA CIVITA, F.; TICCONI, C.; RAGO, R.; CAMPAGNOLO, L. Molecular signaling regulating endometrium–blastocyst crosstalk.

International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 1, 2020.

MATSUO, M.; HIROTA, Y.; FUKUI, Y.; FUJITA, H.; SAITO-FUJITA, T.; KAKU, T.; GEBRIL, M.; HIRATA, T.; AKAEDA, S.; HIRAOKA, T.; TANAKA, T.; HARAGUCHI, H.; SAITO-KANATANI, M.; SHIMIZU-HIROTA, R.; TAKEDA, N.; FUJII, T.; OSUGA, Y. Levonorgestrel Inhibits Embryo Attachment by Eliminating Uterine Induction of Leukemia Inhibitory Factor. **Endocrinology (United States)**, v. 161, n. 2, p. 1–12, 2020.

MATTHEIJ, J. A. M.; SWARTS, J. J. M.; LOKERSE, P.; KAMPEN, J. T. VAN; HEIDE, D. VAN DER. Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. **Journal of Endocrinology**, 1995.

MEDEIROS, Y. S.; CALIXTO, J. B. Effect of induced thyroid dysfunction upon uterine responsiveness in strips from pregnant and nonpregnant rats. **Pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 235–242, 1989.

MÉNDEZ-TEPEPA, M.; ZEPEDA-PÉREZ, D.; ESPINDOLA-LOZANO, M.; RODRÍGUEZ-CASTELÁN, J.; ARROYO-HELGUERA, O.; PACHECO, P.; NICOLÁS-TOLEDO, L.; CUEVAS-ROMERO, E. Hypothyroidism modifies differentially the content of lipids and glycogen, lipid receptors, and intraepithelial lymphocytes among oviductal regions of rabbits. **Reproductive Biology**, v. 20, n. 2, p. 247–253, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.02.004>>.

MENG, L.; RIJNTJES, E.; SWARTS, H.; BUNSCHOTEN, A.; VAN DER STELT, I.; 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.

MESEGUER, M.; APLIN, J. D.; CABALLERO-CAMPO, P.; O'CONNOR, J. E.; MARTÍN, J. C.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A.; SIMÓN, C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 590–601, 2001.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. J. R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1761–1766, 2005.

MORIYAMA, T.; YONEDA, Y.; OKA, M.; YAMADA, M. Transportin-2 plays a critical role in nucleocytoplasmic shuttling of oestrogen receptor- α . **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75631-3>>.

MURPHY, B. D. Models of Luteinization. **Biology of Reproduction**, v. 11, p. 2–11, 2000.

OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S.; MATSUMOTO, H.; HORI, A.; KANEHASHI, K.; TERAOKA, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; MASUDA, Y.; ISHIBASHI, Y.; WATANABE, T.; ASADA, M.; YAMADA, T.; SUENAGA, M.; KITADA, C.; USUKI, S.; KUROKAWA, T.; ONDA, H.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, maio 2001. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/35079135>>.

OKADA, A.; OHTA, Y.; INOUE, S.; HIROI, H.; MURAMATSU, M.; IGUCHI, T. Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and pre-implantations rats. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 30, n. 3, p. 301–315, 2003.

OLIVEIRA, T. S.; NUNES, V. A.; NASCIMENTO, E. F.; SERAKIDES, R.

- Histomorfometria e histoquímica da tuba uterina e do útero de ratas púberes e pré-púberes induzidas ao hipertireoidismo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 448–456, 2005.
- OSORIO, A.; RUIZ, E.; ORTEGA, E. Possible role of GH/IGF-1 in the ovarian function of adult hypothyroid rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 179, n. 1–2, p. 7–11, 1998.
- OWENS, L. A.; ABBARA, A.; LERNER, A.; O’FLOINN, S.; CHRISTOPOULOS, G.; KHANJANI, S.; ISLAM, R.; HARDY, K.; HANYALOGLU, A. C.; LAVERY, S. A.; DHILLO, W. S.; FRANKS, S. The direct and indirect effects of kisspeptin-54 on granulosa lutein cell function. **Human Reproduction**, v. 33, n. 2, p. 292–302, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article/33/2/292/4675060>>.
- PARK, D. W.; LEE, S. K.; HONG, S. R.; HAN, A. R.; KWAK-KIM, J.; YANG, K. M. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 2, p. 132–139, 2012.
- PARK, J.-S.; LEE, S.-H. Effects of Maternal Hypothyroidism on the Pubertal Development in Female Rat Offspring. **Development & Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 83–91, 2021.
- PATEL, B.; ELGUERO, S.; THAKORE, S.; DAHOUD, W.; BEDAIWY, M.; MESIANO, S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 2, p. 155–173, 2015.
- PAWAR, S.; LAWS, M. J.; BAGCHI, I. C.; BAGCHI, M. K. Uterine epithelial estrogen receptor- α controls decidualization via a paracrine mechanism. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 9, p. 1362–1374, 2015.
- PÉREZ MARTÍNEZ, S.; HERMOSO, M.; FARINA, M.; RIBEIRO, M. L.; RAPANELLI, M.; ESPINOSA, M.; VILLALÓN, M.; FRANCHI, A. 17- β -Estradiol upregulates COX-2 in the rat oviduct. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 80, n. 3–4, p. 155–164, 2006.
- POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 149–161, 2003.
- RATAJCZAK, C. K.; FAY, J. C.; MUGLIA, L. J. Preventing preterm birth: The past limitations and new potential of animal models. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 3, n. 7–8, p. 407–414, 2010.
- RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; GREENE, G. L.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: Studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 2, p. 307–319, 1999.
- RODRÍGUEZ-CASTELÁN, J.; DEL MORAL-MORALES, A.; PIÑA-MEDINA, A. G.; ZEPEDA-PÉREZ, D.; CASTILLO-ROMANO, M.; MÉNDEZ-TEPEPA, M.; ESPINDOLA-LOZANO, M.; CAMACHO-ARROYO, I.; CUEVAS-ROMERO, E. Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. **Life Sciences**, v. 230, n. March, p. 111–120, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.063>>.
- RUOHONEN, S. T.; GAYTAN, F.; USSEGLIO GAUDI, A.; VELASCO, I.; KUKORICZA, K.; PERDICES-LOPEZ, C.; FRANSSEN, D.; GULER, I.; MEHMOOD, A.; ELO, L. L.; OHLSSON, C.; POUTANEN, M.; TENA-SEMPERE, M. Selective loss of kisspeptin signaling in oocytes causes progressive premature ovulatory failure. **Human Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 806–821, 2022.
- SAAEELDIN, I. M.; KOO, O. J.; KANG, J. T.; KWON, D. K.; PARK, S. J.; KIM, S. J.;

- MOON, J. H.; OH, H. J.; JANG, G.; LEE, B. C. Paradoxical effects of kisspeptin: It enhances oocyte in vitro maturation but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 656–668, 2012.
- SANTOS, B. R.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTOS, L. C.; DE OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, L. D.; SANTOS, E. O.; DE MACEDO, I. O.; SZAWKA, R. E.; SERAKIDES, R.; SILVA, J. F. Maternal hypothyroidism reduces the expression of the kisspeptin/Kiss1r system in the maternal-fetal interface of rats. **Reproductive Biology**, v. 22, n. 2, p. 16–20, 2022.
- SANTOS, L. C.; DOS ANJOS CORDEIRO, J. M.; SANTANA, L. da S.; SANTOS, B. R.; BARBOSA, E. M.; DA SILVA, T. Q. M.; CORRÊA, J. M. X.; NIELLA, R. V.; LAVOR, M. S. L.; DA SILVA, E. B.; DE MELO OCARINO, N.; 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, 2021.
- SCHAEFER, J.; VILOS, A. G.; VILOS, G. A.; BHATTACHARYA, M.; BABWAH, A. V. Uterine kisspeptin receptor critically regulates epithelial estrogen receptor α transcriptional activity at the time of embryo implantation in a mouse model. **Molecular Human Reproduction**, v. 27, n. 10, p. 1–13, 2021.
- SCHÄFER-SOMI, S.; KAYA, D.; SÖZMEN, M.; KAYA, S.; ASLAN, S. Pre-pubertal treatment with a GnRH agonist in bitches—Effect on the uterus and hormone receptor expression. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. August, p. 103–109, 2018.
- SCHAFFER, A.; HAJAGOS-TÓTH, J.; DUCZA, E.; BÓDI, N.; BAGYÁNSZKI, M.; SZALAI, Z.; GÁSPÁR, R. The ontogeny of kisspeptin receptor in the uterine contractions in rats: Its possible role in the quiescence of non-pregnant and pregnant uteri. **European Journal of Pharmacology**, v. 896, n. January, p. 1–9, 2021.
- SERAKIDES, R.; SILVA, J. F.; VIDIGAL, P. N.; GALVO, D. D.; BOELONI, J. N.; NUNES, P. P.; OCARINO, N. M.; NASCIMENTO, E. F. 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.
- SERES-BOKOR, A.; KEMÉNY, K. K.; TAHERIGORJI, H.; SCHAFFER, A.; KOTHENCZ, A.; GÁSPÁR, R.; DUCZA, E. The effect of citral on aquaporin 5 and trpv4 expressions and uterine contraction in rat—an alternative mechanism. **Life**, v. 11, n. 9, p. 1–9, 2021.
- SHAN, L.; ZHOU, Y.; PENG, S.; WANG, X.; SHAN, Z.; TENG, W. Implantation failure in rats with subclinical hypothyroidism is associated with LIF/STAT3 signaling. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 6, p. 718–727, 2019.
- SHARMA, A.; THAVENTHIRAN, T.; MINHAS, S.; DHILLO, W. S.; JAYASENA, C. N. **Kisspeptin and testicular function—is it necessary?** *International Journal of Molecular Sciences* 2020.
- SHEN, M. M.; LEDER, P. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 17, p. 8240–8244, 1992.
- SHIRLEY, B.; REEDER, R. L. Cyclic Changes in the ampulla of the rat oviduct. **Journal of Experimental Zoology**, v. 276, n. 2, p. 164–173, 1996.
- SIKORA, K.; LYNDIN, M.; HYRIAVENKO, N.; LYNDINA, Y.; ROMANIUK, A.; SIKORA, V. Morphological features of the rat uterus. **Polski Merkuriusz Lekarski**, v. 49, n.

294, p. 420–425, 2021.

SILVA, C. M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T. S.; OCARINO, N. M.; NASCIMENTO, E. F.; NUNES, V. A. Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireóideas em metaestro-diestro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 628–639, 2004.

SILVA, J. F.; HENRIQUES, P. C.; CAMPIDELI-SANTANA, A. C.; ARAUJO-LOPES, R.; AQUINO, N. S. S.; HIPOLITO, L. T. M.; LOPES-AGUIAR, C.; REIS, A. M.; GRATTAN, D. R.; SZAWKA, R. E. Estradiol potentiates but is not essential for prolactin-induced suppression of LH pulses in female rats. **ENDOCRINOLOGY**, v. 0, n. 0, p. 000, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10106049.2021.1970244>>.

SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Luteal activity of pregnant rats with hypo- and hyperthyroidism. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2014a.

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, 2014b.

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, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.11.003>>.

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.; OCARINO, N.; VIEIRA, A.; NASCIMENTO, E.; SERAKIDES, R. Effects of hypo- and hyperthyroidism on proliferation, angiogenesis, apoptosis and expression of COX-2 in the corpus luteum of female rats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 691–698, 2013.

SMITH, J. T. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 94–102, 2009.

SMITH, J. T.; CLAY, C. M.; CARATY, A.; CLARKE, I. J. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 1150–1157, 2007.

SMITH, J. T.; POPA, S. M.; CLIFTON, D. K.; HOFFMAN, G. E.; STEINER, R. A. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 25, p. 6687–6694, 2006.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219–226, 1975.

SONE, K.; YAMAMOTO-SAWAMURA, T.; KUWAHARA, S.; NISHIJIMA, K.; OHNO, T.; AOYAMA, H.; TANAKA, S. Changes of estrous cycles with aging in female F344/N rats. **Experimental Animals**, v. 56, n. 2, p. 139–148, 2007.

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, 2017.

STEWART, C. L.; KASPAR, P.; BRUNET, L. J.; BHATT, H.; GADI, I.; KÖNTGEN, F.; ABBONDANZO, S. J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. **Nature**, v. 359, p. 710–713, 1992. Disponível em:

<file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/p21/xiong1993.pdf>.

SURVEYOR, G. A.; GENDLER, S. J.; PEMBERTON, L.; DAS, S. K.; CHAKRABORTY, I.; JULIAN, J.; PIMENTAL, R. A.; WEGNER, C. C.; DEY, S. K.; CARSON, D. D. Expression and Steroid Hormonal Control of Muc-1 in the Mouse Uterus. **Society**, v. 136, n. 8, p. 3639–3647, 1995.

TAS, M.; KUTUK, M. S.; SERIN, I. S.; OZGUN, M. T.; ONER, G.; OZTURK, F. Comparison of antiproliferative effects of metformine and progesterone on estrogen-induced endometrial hyperplasia in rats. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 4, p. 311–314, 2013.

TEESALU, T.; BLASI, F.; TALARICO, D. Embryo implantation in mouse: Fetomaternal coordination in the pattern of expression of uPA, uPAR, PAI-1 and α 2MR/LRP genes. **Mechanisms of Development**, v. 56, n. 1–2, p. 103–116, 1996.

TERAO, Y.; KUMANO, S.; TAKATSU, Y.; HATTORI, M.; NISHIMURA, A.; OHTAKI, T.; SHINTANI, Y. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1678, n. 2–3, p. 102–110, 25 maio 2004.

TIBBETTS, T. A.; MENDOZA-MENESES, M.; O'MALLEY, B. W.; CONNEELY, O. M. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1143–1152, 1998.

TIMOLOGOU, A.; ZAFRAKAS, M.; GRIMBIZIS, G.; MILIARAS, D.; KOTRONIS, K.; STAMATOPOULOS, P.; TARLATZIS, B. C. Immunohistochemical expression pattern of metastasis suppressors KAI1 and KISS1 in endometriosis and normal endometrium. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 199, p. 110–115, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.02.004>>.

TOHEI, A.; TAYA, K.; WATANABE, G.; VOOGT, J. L. Hypothyroidism increases prolactin secretion and decreases the intromission threshold for induction of pseudopregnancy in adult female rats. **Physiology and Behavior**, v. 69, n. 4–5, p. 391–397, 2000.

TOMORI, Y.; TAKUMI, K.; IJIMA, N.; TAKAI, S.; OZAWA, H. Kisspeptin expression is decreased in the arcuate nucleus of hypothyroid female rats with irregular estrus cycles. **Neuroscience Research**, v. 117, p. 35–41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2016.11.005>>.

VERHAGE, H. G.; BOOMSMA, R. A.; MURRAY, M. K.; JAFFE, R. C. Subcellular compartmentalization of the progesterone receptor in cat uteri following the acute administration of progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 545–550, 1983.

WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology**, v. 20, n. 3, p. 180–193, 2005.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 375–384, 2008.

WETENDORF, M.; DEMAYO, F. J. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 357, n. 1–2, p. 108–118, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.028>>.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; MIYAMOTO, A.; TAQUAHASHI, Y.; GABLER, C.; ACOSTA, T. J.; NISHIMURA, M.; KILLIAN, G.; SATO, K. In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: Stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 1, p. 117–130, 2001.

WINUTHAYANON, W.; BERNHARDT, M. L.; PADILLA-BANKS, E.; MYERS, P. H.; EDIN, M. L.; LIH, F. B.; HEWITT, S. C.; KORACH, K. S.; WILLIAMS, C. J. Oviductal estrogen receptor α signaling prevents protease-mediated embryo death. **eLife**, v. 4, p. 1–28, 2015.

WU, S.; ZHANG, H.; TIAN, J.; LIU, L.; DONG, Y.; MAO, T. Expression of kisspeptin/GPR54 and PIBF/PR in the first trimester trophoblast and decidua of women with recurrent spontaneous abortion. **Pathology Research and Practice**, v. 210, n. 1, p. 47–54, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2013.09.017>>.

YI, Y.; ZHU, H.; KLAUSEN, C.; CHANG, H. M.; INKSTER, A. M.; TERRY, J.; LEUNG, P. C. K. Dysregulated BMP2 in the Placenta May Contribute to Early-Onset Preeclampsia by Regulating Human Trophoblast Expression of Extracellular Matrix and Adhesion Molecules. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. December, p. 1–18, 2021.

ZEYNELOGLU, H. B.; ARICI, A.; OLIVE, D. L. Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 70, n. 3, p. 492–499, 1998.

ZHANG, P.; TANG, M.; ZHONG, T.; LIN, Y.; ZONG, T.; ZHONG, C.; ZHANG, B. P.; REN, M.; KUANG, H. Bin. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 15 maio 2014.

ZHANG, R.; CHENG, F.; CHENG, W.; WANG, X.; ZHANG, B.; TIAN, M.; LI, K.; LIU, D. The Relationships among Plasma Fetuin-B, Thyroid Autoimmunity, and Fertilization Rate in Vitro Fertilization and Embryo Transfer. **International Journal of Endocrinology**, v. 2022, 2022.

ZHAO, W.; ZHU, Q.; YAN, M.; LI, C.; YUAN, J.; QIN, G.; ZHANG, J. Levonorgestrel decreases cilia beat frequency of human fallopian tubes and rat oviducts without changing morphological structure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 2, p. 171–178, 2015.

