



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

3
4
5
6
7 **BIANCA REIS SANTOS**

8
9
10
11 **PAPEL MODULATÓRIO DE KISSPEPTINA NA**
12 **HOMEOSTASE GLICÊMICA E EIXO PLACENTA-**
13 **PÂNCREAS EM RATAS COM HIPOTIREOIDISMO**
14 **MATERNO:**

15 **UMA AVALIAÇÃO INTERGERACIONAL**

16
17
18
19
20
21
22
23 **ILHÉUS - BAHIA**

24 **2025**

1 **BIANCA REIS SANTOS**

2

3

4

5

6

7

8

9 **PAPEL MODULATÓRIO DE KISSPEPTINA NA**
10 **HOMEOSTASE GLICÊMICA E EIXO PLACENTA-**
11 **PÂNCREAS EM RATAS COM HIPOTIREOIDISMO**
12 **MATERNO:**

13 **UMA AVALIAÇÃO INTERGERACIONAL**

14

15

16

17

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

18

19

20

21

Linha de pesquisa: Biotecnologia e
Experimentação Animal

22

23

Subárea: Patologia Comparada e Experimental

24

Orientador: Prof. Dr. Juneo Freitas Silva

25

Coorientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

26

27

28

29

30 **ILHÉUS - BAHIA**

31

2025

1 **BIANCA REIS SANTOS**

2
3
4
5 **PAPEL MODULATÓRIO DE KISSPEPTINA NA HOMEOSTASE GLICÊMICA E**
6 **EIXO PLACENTA-PÂNCREAS EM RATAS COM HIPOTIREOIDISMO**
7 **MATERNO: UMA AVALIAÇÃO INTERGERACIONAL**
8

9
10 Ilhéus – BA, 25/02/2025

11
12
13
14

Dr. Juneo Freitas Silva
15 **UESC/DCB**
16 **(Orientador)**
17

18
19
20

Dr^a. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua
21 **USP/ICB**
22

23
24
25

Dr^a. Patricia Cristina Lisboa
26 **UERJ/DCF**
27

28
29
30

Dr^a Karina Barbosa de Queiroz
31 **UFOP/DEALI**
32

33
34
35

Dr^a. Fabiana Lessa Silva
36 **UESC/DCAA**
37

38
39
40 **ILHÉUS - BAHIA**

41
42 **2025**

1

2

3

4 Dedico a Maria José Vieira dos Santos (*in memoriam*), minha eterna e amada vovó Zezé,
5 por todo amor e carinho. “*Bença vó!* ”

6

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui, pela proteção divina, saúde, sabedoria e forças para continuar apesar das adversidades, e pelo refúgio nos momentos de necessidade. Por nunca me faltar em nenhum momento, e por colocar pessoas maravilhosas ao longo dessa trajetória que pudessem me ajudar de diversas formas.

Aos meus pais, Erisvaldo Alves dos Santos e Jocimara Reis Santos, pai e mãe, pelo amor e carinho, por sempre apoiarem minhas decisões e sonharem os meus sonhos. Pelos ensinamentos, que me fizeram a mulher que sou hoje. Por sempre me oferecerem colo e afeto, por sempre secarem minhas lágrimas, por não só entenderem os momentos de ausência por ter que estar trabalhando (foram muitos), como me ampararem quando estive cansada, e por serem o meu porto seguro e refúgio, aqueles que sempre poderei contar. Amo vocês imensamente.

Aos meus avós, Florisvaldo Alves dos Santos (*in memoriam*) e Maria José Vieira dos Santos (*in memoriam*), meus eternos Vovô Flori e Vovó Zezé, e Emília Pinheiro Reis, Vovó Emília, por nunca me faltarem com zelo, amor e carinho, por sempre vibrarem com minhas vitórias da maneira mais genuína. Pelos ensinamentos que nenhum poderia me ensinar. A bênção, meus avós!

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

A todos os meus amigos, os de longa data, por todos os anos de convivência, sintonia e parceria. Aos recentes, que apesar do pouco tempo, marcaram imensamente a minha vida. A todos vocês, obrigada pelos momentos de descontração, mas também por estarem ao meu lado nos momentos difíceis. Obrigada por entenderem os vários “hoje não posso, tenho experimento” e por respeitarem os vários momentos de bateria social descarregada devido ao cansaço. Aos meus “flatmates” e amigos que conheci em Cambridge, por me fazerem sentir em casa, mesmo tão longe.

Ao meu orientador Professor Dr. Juneo Freitas Silva, por todos esses anos de compartilhamento de conhecimentos, por ter enxergado e ajudado no meu propósito de ser pesquisadora. Por sempre tentar tirar o melhor, mesmo quando eu mesma não via.

1 A todos do Núcleo de Pesquisa em Reprodução e Endocrinologia (NuRE), colegas de
2 pós-graduação, Erikles, Thayná, Maria Clara, Cibele e Emily, pelas ajudas no experimento,
3 pelas trocas e por dividirem bancada comigo. Às ICs, Maria Clara, Cleisla, Aline, Natalia, às
4 ex-ICs, Letícia, Brena, Isabela e Larissa, pelas discussões de assuntos acadêmicos ou aleatórios,
5 pelos ensinamentos, por serem meus olhos e mãos extras. Aos colaboradores do NuRE, pela
6 parceria, em especial à Professora Dr^a Rogéria Serakides, também minha coorientadora, e ao
7 seu orientando e hoje Professor Felipe Pastor, pela colaboração nesse lindo trabalho aqui
8 apresentado.

9 Aos atuais, e com muito orgulho, Doutores e Professores Luciano e Jeane, por toda ajuda
10 desde o início de tudo, todas as trocas, todas as discussões, todos os desabafos e os pedidos de
11 socorro atendidos. Muito obrigada por toda essa linda parceria construída, e que continuemos
12 com muitas outras.

13 Aos meus colegas de pós-graduação, por atenderem aos pedidos de ajuda e pelas
14 discussões de assuntos sempre enriquecedoras, além dos momentos de descontração.

15 À Dona Jacira, Jacinha, por cuidar de mim todos esses anos na UESC, ser uma mãezona,
16 por todos os abraços, cafés e conversas. Amo a senhora, Jacinha.

17 Ao Seu Zé Carlos, por toda ajuda e zelo com os animais do biotério.

18 Aos membros e funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, Hospital
19 Veterinário, Centro de Biotecnologia e Genética, e Laboratório de Biotecnologia, pelo suporte
20 e apoio técnico na realização das técnicas laboratoriais.

21 Aos guardas do patrimônio da instituição, pelo zelo com a instituição e conosco, em
22 especial aos da guarita, por prontamente abriam a cancela ao me ver do outro lado da pista na
23 minha “bizinha branca”, aos finais de semana e feriados, na chuva ou no sol.

24 A todos os professores da instituição que tive o prazer de conhecer e trocar
25 conhecimentos.

26 À Professora Dr^a Amanda Sferruzi-Perri, por abrir as portas do seu laboratório para
27 mim, além de todas as conversas e trocas, e todos os ensinamentos, o período em seu laboratório
28 foi muito enriquecedor e fundamental na minha vida pessoal e profissional.

1 A todos os integrantes do ASP lab, Jorge, Jonas, Cindy, Edina, Yudan, Suqi e Ivona,
2 pelo acolhimento, apoio e ajuda nas técnicas que aprendi. Em especial, Victoria e Laila, que
3 apesar do curto tempo juntas, me ajudaram muito na adaptação a essa drástica mudança. A
4 todos, muito obrigada por me fazerem sentir acolhida e pertencente.

5 Também agradeço ao Centre for Trophoblast Research, ao Departamento de Fisiologia,
6 Desenvolvimento e Neurociência, e à Universidade de Cambridge, por me receberem e pela
7 infraestrutura.

8 À Universidade Estadual de Santa Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência
9 Animal, pelo suporte e infraestrutura, possibilitando o desenvolvimento e concretização da
10 nossa pesquisa.

11 À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
12 pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche no exterior concedida.

13 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo
14 financiamento do projeto (processo 402515/2021-8).

15 A todos que me ajudaram a chegar até aqui direta ou indiretamente.

16 A todos esses, sou e serei eternamente grata.

17

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

*“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu passarinho”.*
Mário Quintana.

1 expressão placentária de reguladores da homeostase glicêmica na prole F2, enquanto a
2 administração materna de Kp10 previne essas alterações feto-placentárias e aumenta a
3 expressão placentária de *Plii*. No **Capítulo 3**, avaliou-se a homeostase glicêmica na prole F1
4 (machos e fêmeas) de ratas hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kp10 por meio do
5 TTIPG e TTIPI, além da glicemia basal e aleatória, aos 30 e 60 dias pós-natal (PN). Os animais
6 foram expostos à dieta hiperlipídica (HFD, 60%) por seis semanas para avaliar o ganho de
7 massa corporal, a ingestão alimentar, a homeostase glicêmica (TTIPG e TTIPI), adiposidade e
8 morfologia de adipócitos, perfil lipídico, enzimas hepáticas, massa hepática e expressão
9 hepática de *Insr*, *Irs* e *mTor*. Antes do desafio, o HM reduziu a sensibilidade à insulina aos 30
10 PN nos machos e aumentou aos 60 PN, enquanto nas fêmeas aumentou a glicemia aleatória e
11 reduziu a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina aos 30 PN. O tratamento com Kp10
12 aumentou a tolerância à glicose nos machos aos 60 PN, enquanto nas fêmeas também aumentou
13 a tolerância à glicose aos 30 PN. Após exposição à dieta HFD, nos machos, o HM aumentou a
14 concentração plasmática de colesterol total e HDL e exacerbou o aumento de massa do tecido
15 adiposo retroperitoneal. Nas fêmeas, o HM acelerou a intolerância à glicose e desregulou a
16 sensibilidade à insulina, reduziu a expressão hepática de *Insr*, e acentuou o acúmulo de tecido
17 adiposo retroperitoneal e marrom. O tratamento com Kp10, por outro lado, apesar de não
18 prevenir as alterações glicêmicas e metabólicas observadas nos machos, nas fêmeas foi capaz
19 de reduzir a intolerância à glicose e restabelecer a sensibilidade à insulina na prole fêmea
20 decorrente da exposição à dieta HFD. Assim, o HM compromete a homeostase glicêmica e
21 exacerba a disfunção metabólica da prole exposta à dieta HFD de forma sexo-dependente, e o
22 tratamento materno com Kp10 melhora a tolerância à glicose na prole fêmea F1, inclusive
23 quando exposta à dieta HFD. Em conjunto, este estudo demonstrou que a disfunção placentária
24 decorrente do HM está associada à desregulação da via mTOR nas placentas das gerações F1 e
25 F2, o que pode impactar a programação metabólica das gerações subsequentes. O tratamento
26 materno com Kp-10 modulou a expressão de sinalizadores da via mTOR e do metabolismo
27 materno e placentário, além de melhorar a tolerância à glicose na prole fêmea jovem, atenuando
28 a intolerância após a exposição à dieta hiperlipídica. Esses achados sugerem que a Kp10 pode
29 ser uma ferramenta terapêutica promissora para doenças gestacionais, contribuindo para a
30 programação metabólica fetal e a proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas na
31 vida adulta.

32
33
34
35 **PALAVRAS-CHAVE:** Dohad; Dieta Hiperlipídica; Kiss; Metabolismo; mTOR; Programação
36 Do Desenvolvimento.

37

38

1 glycemic homeostasis in F2 offspring, whereas maternal administration of Kp10 prevents these
2 fetoplacental alterations and increases placental *Plii* expression. In **Chapter 3**, glycemic
3 homeostasis was evaluated in the F1 offspring (males and females) of hypothyroid and
4 hypothyroid rats treated with Kp10 by means of TTIPG and TTIPI, in addition to basal and
5 random glycemia, at 30 and 60 postnatal days (PN). The animals were exposed to a high-fat
6 diet (HFD, 60%) for six weeks to evaluate body mass gain, food intake, glycemic homeostasis
7 (TTIPG and TTIPI), adiposity and adipocyte morphology, lipid profile, liver enzymes, liver
8 mass and hepatic expression of *Insr*, *Irs* and *mTor*. Before the challenge, MH reduced insulin
9 sensitivity at 30 PN in males and increased it at 60 PN, while in females it increased random
10 glycemia and reduced glucose tolerance and insulin sensitivity at 30 PN. Kp10 treatment
11 increased glucose tolerance in males at 60 PN, while in females it also increased glucose
12 tolerance at 30 PN. After exposure to the HFD diet, in males, MH increased plasma
13 concentrations of HDL and total cholesterol and exacerbated the increase in retroperitoneal
14 adipose tissue mass. In females, MH accelerated glucose intolerance and dysregulated insulin
15 sensitivity, reduced hepatic *Insr* expression, and accentuated the accumulation of
16 retroperitoneal and brown adipose tissue. Kp10 treatment, on the other hand, although it did not
17 prevent the glycemic and metabolic changes observed in males, in females it was able to reduce
18 glucose intolerance and restore insulin sensitivity in female offspring resulting from exposure
19 to the HFD diet. Thus, MH compromises glycemic homeostasis and exacerbates metabolic
20 dysfunction in offspring exposed to a HFD diet in a sex-dependent manner, and maternal
21 treatment with Kp10 improves glucose tolerance in F1 female offspring, including when
22 exposed to a HFD diet. Taken together, this study demonstrated that placental dysfunction
23 resulting from MH is associated with dysregulation of the mTOR pathway in the placentas of
24 the F1 and F2 generations, which may impact the metabolic programming of subsequent
25 generations. Maternal treatment with Kp-10 modulated the expression of mTOR pathway
26 signaling and maternal and placental metabolism, in addition to improving glucose tolerance in
27 young female offspring, attenuating intolerance after exposure to a high-fat diet. These findings
28 suggest that Kp10 may be a promising therapeutic tool for gestational diseases, contributing to
29 fetal metabolic programming and protection against the development of chronic diseases in
30 adulthood.

31

32

33 **Key words:** DOHaD; development programming; kiss; mTOR; high-fat diet; Metabolism.

34

35

1
2
3
4
5
6
7
8
9

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.....53

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.....81

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.....106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1

2

CAPÍTULO 1

3 **Figura 1 Perfil metabólico materno de ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas**
4 **tratadas com Kissseptina-10 (Kp10).** A) Dosagem plasmática de T4 livre aos 18 DG. B)
5 **Glicemia em jejum aos 16 DG.** C) Glicemia aleatória aos 18 DG. D) Insulina plasmática
6 aleatória aos 18 DG. E) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 16 DG. F) Área
7 sob a curva do TTIPG. G) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 16 DG. H) Área
8 sob a curva do TTIPI. I) Fotomicrografia do pâncreas com imunomarcagem de insulina
9 (Streptavidina-biotina-peroxidase, Hematoxilina de harris, Barra = 20 µm e 50 µm; J) Massa
10 do pâncreas relativa à massa corporal materna aos 14 e 18 DG. K) Número de ilhotas de
11 Langerhans por mm² aos 14 e 18 DG. L) Triglicerídeos aos 18 DG. M) Colesterol Total aos 18
12 DG. N) HDL aos 18 DG. O) LDL aos 18 DG (Anova de uma ou duas vias post hoc SNK;
13 Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ***
14 $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, exceto do E que * $P < 0,05$ controle vs. Hipotireoideo; ** $P < 0,01$
15 controle vs. Hipotireoideo; # $P < 0,05$ controle vs. Kp10; ## $P < 0,01$ controle vs. Kp10; ### P
16 $< 0,001$ controle vs. Kp10. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste
17 de tolerância intraperitoneal à insulina; DG = dias de gestação. HDL = *High Density*
18 *Lipoprotein*; LDL = *Low Density Lipoprotein*.....56

19 **Figura 2 Dados maternos e da prole de ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas**
20 **tratadas com Kissseptina-10 (Kp10).** A) Ganho de massa corporal histerectômica materno
21 aos 18 DG. B) Número de fetos viáveis aos 14 e 18 DG. C) Taxa de morte fetal aos 14 e 18
22 DG. D) Massa corporal fetal aos 14 e 18 DG. E) Massa placentária aos 14 e 18 DG. F) Eficiência
23 placentária aos 14 e 18 DG. G) Glicemia fetal aos 18 DG. H) Insulina plasmática fetal aos 18
24 DG. I) Massa corporal da prole neonatal e jovem. (A-C, H-I: Anova de uma via post hoc SNK;
25 D-G: Modelo linear misto post hoc Bonferroni Média±SEM). As diferenças significativas estão
26 representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. Nos gráficos D-G foi
27 feita a sobreposição de gráficos da média±SEM corrigidos pelo modelo linear misto, e a
28 distribuição individual dos fetos, no Adobe Illustrator. DG = dias de gestação.....58

29 **Figura 3 Avaliação da morfologia placentária de ratas controle, hipotireoideas e**
30 **hipotireoideas tratadas com Kissseptina-10 (Kp10).** A) Fotomicrografias de placentas aos
31 14 DG (Hematoxilina& Eosina; Aumento de x5; Barra = 2,5 mm). B) Volume absoluto das
32 zonas da placenta aos 14 e 18 DG. C) Fotomicrografias da coloração de PAS na zona juncional
33 (PAS; Fast Green; Aumento de 400x; Barra = 50µm). D) Área em pixels coradas por PAS aos
34 14 e 18 DG. E) Fotomicrografias da dupla marcação por citoqueratina + vimentina
35 (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Fosfatase Alcalina-BCIP/NBT; Fast Red; Aumento de
36 800x; Barra = 20µm) F) Volume absoluto dos compartimentos da zona de labirinto aos 14 e 18
37 DG. G) Área de superfície da vasculatura da zona de labirinto aos 14 e 18 DG. H) Comprimento
38 total do capilar fetal aos 14 e 18 DG. I) Área do capilar fetal aos 14 e 18 DG. J) Diâmetro do
39 capilar fetal aos 14 e 18 DG. K) Espessura da Membrana Intravascular aos 14 e 18 DG. L)
40 Capacidade de difusão teórica da membrana interhemal aos 14 e 18 DG. M) Capacidade de
41 difusão específica da membrana interhemal aos 14 e 18 DG. (Média±SEM). As diferenças
42 significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, para Anova de uma via post hoc
43 SNK. # $P < 0,05$, para teste t de Student. DG = dias de gestação; DB = decídua basal; JZ= Zona
44 Juncional; LZ= Zona de labirinto; SpT= Espongiotrofoblasto; Gly= Células de glicogênio; TGC
45 = Células gigantes trofoblástica; PAS = Ácido Periódico de Schiff; TB = trofoblasto; MBS =
46 Espaço Vascular Materno. Barra vermelha = Membrana intravascular. Barra= 50µm.....60

1 **Figura 4 Avaliação da expressão de Glut1 e fatores hormonais em placentas de ratas**
2 **controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A)
3 Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 na placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-
4 peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels
5 da expressão de Glut1 aos 14 DG. C) Expressão gênica de Glut1, Pl ii, rPrl e Leptina aos 14
6 DG. D) Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-
7 biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). E) Área de imunomarcção
8 em pixels da expressão de Glut1 aos 18 DG. F) Expressão gênica de Glut1, Pl ii rPrl e Leptina
9 aos 18 DG. (Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, **
10 P < 0,01, *** P < 0,001, ****P < 0,0001, para Anova de uma via post hoc SNK. DG = dias de
11 gestação. Barra= 50µm.....62

12 **Figura 5 Avaliação da expressão do sistema INSR/IGF1/IGF1R em placentas de ratas**
13 **controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A)
14 Fotomicrografias da imunomarcção de INSRβ na placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-
15 peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels
16 da expressão de INSRβ aos 14 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1r na
17 placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de
18 400x). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de IGF1r aos 14 DG. E) Expressão
19 gênica de Insr, Irs1, Igf1 e Igf1r aos 14 DG. F) Fotomicrografias da imunomarcção de INSRβ
20 na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento
21 de 400x). G) Área de imunomarcção em pixels da expressão de INSRβ aos 18 DG. H)
22 Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1r na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-
23 peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). I) Área de imunomarcção em pixels
24 da expressão de IGF1r aos 18 DG. J) Expressão gênica de Insr, Irs1, Igf1 e Igf1r aos 18 DG.
25 (Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, ***
26 P < 0,001, ****P < 0,0001, para Anova de uma via post hoc SNK; # P < 0,05, para teste t de
27 Student. DG = dias de gestação. Barra= 50µm.....64

28 **Figura 6 Avaliação da sinalização AKT/ mTOR em placentas de ratas controle,**
29 **hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) Fotomicrografias
30 da imunomarcção de AKT na placenta aos 14 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase;
31 Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão
32 de AKT aos 14 GD. C) Fotomicrografias da imunomarcção de p-mTOR na placenta aos 14
33 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área
34 de imunomarcção em pixels da expressão de p-mTOR aos 14 GD. E) Expressão gênica de
35 mTor e Raptor aos 14 GD. F) Fotomicrografias da imunomarcção de AKT na placenta aos 18
36 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). G) Área
37 de imunomarcção em pixels da expressão de AKT aos 18 GD. H) Fotomicrografias da
38 imunomarcção de p-mTOR na placenta aos 18 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase;
39 Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). I) Área de imunomarcção em pixels da expressão
40 de p-mTOR aos 18 GD. J) Expressão gênica de mTor e Raptor aos 18 GD. (Anova de uma via
41 post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05,
42 ** P < 0,01, *** P < 0,001, ****P < 0,0001. GD = dias de gestação. Barra= 50µm.....67

2 **Figura 1 Avaliação da massa corporal, níveis de T4 livre e insulina e da homeostase**
 3 **glicêmica de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com**
 4 **Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1).** A) Curva de ganho de massa corporal materna. B) Área sob a
 5 curva do ganho de massa corporal materna. C) Dosagem plasmática de T4 livre. D) Curva
 6 glicêmica do teste de tolerância à glicose aos DG 16. E) Área sob a curva do TTIPG. F) Curva
 7 glicêmica do teste de tolerância à insulina aos DG 16 DG. G) Área sob a curva do TTIPI. H)
 8 Glicemia em jejum aos DG 16. I) Glicemia aleatória aos DG 18. J) Insulina plasmática aleatória
 9 aos DG 18. (Anova de uma ou duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças
 10 significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P <0,01, *** P <0.001, ****P <0,0001,
 11 exceto do A que * P <0,05 controle-F1 vs. Kp10-F1; ** P <0,01 controle-F1 vs. Kp10-F1; # P
 12 <0,05 Hipotireoideo-F1 vs. Kp10-F1. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose;
 13 IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; DG = dias de gestação.....84

14 **Figura 2 Parâmetros reprodutivos de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e**
 15 **hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1).** A) Número de fetos viáveis aos
 16 18 DG. B) Taxa de morte fetal aos 18 DG. C) Massa estimada de líquido amniótico por feto
 17 aos 18 DG. D) Massa da unidade útero-placenta aos 18 DG. E) Espessura das camadas
 18 placentárias aos 18 DG. F) Comprimento fetal aos 18 DG. G) Curva de distribuição da massa
 19 corporal fetal aos 18 DG. H) Massa corporal fetal aos 18 DG. I) Massa relativa dos órgãos fetais
 20 aos 18 DG. J) Relação cérebro-fígado aos 18 DG. (A, C-E: Anova de uma via post hoc SNK;
 21 Média±SEM; B: Kruskal-Wallis post hoc Dunn's; Plot de violino; F,H-J: Modelo linear misto
 22 post hoc Bonferroni; Média±SEM; G: Regressão não-linear para Distribuição Gaussiana; Mean
 23 = 1,419; 10th = 1,263; 90th= 1,575). As diferenças significativas estão representadas por * P
 24 < 0,05, ** P <0,01. Nos gráficos F-J foi feita a sobreposição de gráficos da média±SEM
 25 corrigidos pelo modelo linear misto, e a distribuição individual dos fetos, no Adobe Illustrator.
 26 DG = dias de gestação.....86

27 **Figura 3 Avaliação de Glut1 e fatores hormonais placentários na interface materno-fetal**
 28 **de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1**
 29 **(Kp10-F1).** A) Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 aos 18 DG (Estreptavidina-
 30 biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção
 31 em pixels da expressão de Glut1 aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de rPRL
 32 aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D)
 33 Área de imunomarcção em pixels da expressão de rPRL aos 18 DG. E) Expressão gênica de
 34 Glut1, Plii, rPrl e Leptina aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As
 35 diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P <0,01. DG = dias de gestação.
 36 Barra = 50µm.....88

37 **Figura 4 Avaliação da via IGF1/IGF1r e da sinalização insulínica na interface materno-**
 38 **fetal de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-**
 39 **10-F1 (Kp10-F1).** A) Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1 aos 18 DG (Estreptavidina-
 40 biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção
 41 em pixels da expressão de IGF1 aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1r
 42 aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D)
 43 Área de imunomarcção em pixels da expressão de IGF1r aos 18 DG. E) Fotomicrografias da
 44 imunomarcção de INSRβ aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de
 45 Harris; Aumento de 400x). F) Área de imunomarcção em pixels da expressão de INSRβ aos
 46 18 DG. G) Expressão gênica de Igf1, Igf1r, Insr e Irs1 aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc

1 SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01,
2 *** P < 0,001, ****P < 0,0001. DG = dias de gestação. Barra = 50 µm.....90

3 **Figura 5 Avaliação da sinalização AKT/mTOR na interface materno-fetal de ratas**
4 **controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-**
5 **F1).** A) Fotomicrografias da imunomarcação de AKT aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-
6 peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcação em pixels
7 da expressão de AKT aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcação de p-mTOR aos 18
8 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área
9 de imunomarcação em pixels da expressão de p-mTOR aos 18 DG. E) Expressão gênica de
10 *mTor e Raptor* aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças
11 significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, ****P < 0,0001.
12 DG = dias de gestação. Barra = 50µm.....92

13

14

CAPÍTULO 3

15 **Figura 1 Dados reprodutivos e de T4 livre de ratas controles, hipotireoideas e**
16 **hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) Níveis plasmáticos de T4 livre. B)
17 Número de partições. C) Comprimento do período gestacional. D) Tamanho de ninhada. E)
18 Proporção de filhotes machos e fêmeas por grupo. F) Níveis plasmáticos de T4 livre na prole
19 aos 3 (neonatal) e 21 (jovem) PN. (A, D, F: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM; C:
20 Kruskal-Wallis post hoc Dunn's; Plot de violino;). As diferenças significativas estão
21 representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, ****P < 0,0001.....107

22 **Figura 2. Desenvolvimento pós-natal e homeostase glicêmica da prole macho de ratas**
23 **controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) **Curva**
24 **de crescimento da prole.** B) Glicemia em jejum aos 30 e 60 PN. C) Glicemia aleatória aos 30
25 e 60 PN. D) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 30 PN. E) Área sob a curva do
26 TTIPG aos 30 PN. F) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 60 PN. G) Área sob
27 a curva do TTIPG aos 60 PN. H) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 30 PN.
28 I) Área sob a curva do TTIPI aos 30 PN. J) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina
29 aos 60 PN. K) Área sob a curva do TTIPI aos 60 PN. (A, D, F, H, J: Anova de duas vias post
30 hoc SNK; Média±SEM; B, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As
31 diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, exceto do A, D, F, H e
32 J, que * P < 0,05 controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; ** P < 0,01 controle-F1 vs. hipotireoideo-F1;
33 **** P < 0,0001 controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; # P < 0,05 controle-F1 vs. Kp10-F1; ### P
34 < 0,001 controle-F1 vs. Kp10-F1; Φ P < 0,05 hipotireoideo-F1 vs. Kp10-F1. IPGTT = Teste de
35 tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; PN
36 = dias pós-natal.....109

37 **Figura 3 Desenvolvimento pós-natal e homeostase glicêmica da prole fêmea de ratas**
38 **controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) **Curva**
39 **de crescimento da prole.** B) Glicemia em jejum aos 30 e 60 PN. C) Glicemia aleatória aos 30
40 e 60 PN. D) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 30 PN. E) Área sob a curva do
41 TTIPG aos 30 PN. F) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 60 PN. G) Área sob
42 a curva do TTIPG aos 60 PN. H) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 30 PN.
43 I) Área sob a curva do TTIPI aos 30 PN. J) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina
44 aos 60 PN. K) Área sob a curva do TTIPI aos 60 PN. (A, D, F, H, J: Anova de duas vias post
45 hoc SNK; Média±SEM; B, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As

1 diferenças significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, exceto
2 do A, D, F, H e J, que * P < 0,05 controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; ** P < 0,01 controle-F1 vs.
3 hipotireoideo-F1; *** P < 0,001 controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; # P < 0,05 controle-F1 vs.
4 Kp10-F1; ## P < 0,01 controle-F1 vs. Kp10-F1; ### P < 0,001 controle-F1 vs. Kp10-F1; Φ Φ P
5 < 0,01 hipotireoideo-F1 vs. Kp10-F1. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose;
6 IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; PN = dias pós-natal.....111

7 **Figura 4 Ganho de massa corporal e homeostase glicêmica da prole macho exposta a dieta**
8 **hiperlipídica de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-**
9 **10 (Kp10).** A) Massa corporal antes da exposição à dieta hiperlipídica. B) Curva de ganho de
10 massa corporal da prole durante exposição a dieta hiperlipídica. C) Média de ingestão de
11 comida. D) Glicemia em jejum após 4 e 6 semanas de HFD. E) Curva glicêmica do IPGTT após
12 4 semanas de HFD. F) Área sob a curva do TTIPG após 4 semanas de HFD. G) Curva glicêmica
13 do IPGTT após 6 semanas de HFD. H) Área sob a curva do TTIPG após 6 semanas de HFD. I)
14 Curva glicêmica do IPITT após 4 semanas de HFD. J) Área sob a curva do TTIPI após 4
15 semanas de HFD. K) Curva glicêmica do IPITT após 6 semanas de HFD. L) Área sob a curva
16 do TTIPI após 6 semanas de HFD. (A, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; B, D, F,
17 H, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). Média±SEM). As diferenças
18 significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, ****P < 0,0001, exceto do C, E,
19 G, I e K, que * P < 0,05 controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ** P < 0,01 controle-F1 vs. controle-
20 F1+HFD; *** P < 0,001 controle-F1 vs. controle-F1+HFD; **** P < 0,0001 controle-F1 vs.
21 controle-F1+HFD; ## P < 0,01 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ### P < 0,001
22 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ##### P < 0,0001 controle-F1+HFD vs.
23 hipotireoideo-F1+HFD; Φ P < 0,05 controle vs. Kp10-F1+HFD; Φ Φ P < 0,01 controle vs. Kp10-
24 F1+HFD; Φ Φ Φ P < 0,001 controle vs. Kp10-F1+HFD; Φ Φ Φ Φ P < 0,0001 controle vs. Kp10-
25 F1+HFD; δ P < 0,05 controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD. IPGTT = Teste de tolerância
26 intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; HFD = dieta
27 hiperlipídica; W= semanas.....113

28 **Figura 5 Ganho de massa corporal e homeostase glicêmica da prole fêmea exposta a dieta**
29 **hiperlipídica de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-**
30 **10 (Kp10).** A) Massa corporal antes da exposição à dieta hiperlipídica. B) Curva de ganho de
31 massa corporal da prole durante exposição a dieta hiperlipídica. C) Média de ingestão de
32 comida. D) Glicemia em jejum após 4 e 6 semanas de HFD. E) Curva glicêmica do IPGTT após
33 4 semanas de HFD. F) Área sob a curva do TTIPG após 4 semanas de HFD. G) Curva glicêmica
34 do IPGTT após 6 semanas de HFD. H) Área sob a curva do TTIPG após 6 semanas de HFD. I)
35 Curva glicêmica do IPITT após 4 semanas de HFD. J) Área sob a curva do TTIPI após 4
36 semanas de HFD. K) Curva glicêmica do IPITT após 6 semanas de HFD. L) Área sob a curva
37 do TTIPI após 6 semanas de HFD. (A, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; B, D, F,
38 H, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). Média±SEM). As diferenças
39 significativas estão representadas por * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001,
40 exceto do C, E, G, I e K, que * P < 0,05 controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ** P < 0,01 controle-
41 F1 vs. controle-F1+HFD; *** P < 0,001 controle-F1 vs. controle-F1+HFD; **** P < 0,0001
42 controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ## P < 0,01 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD;
43 ### P < 0,001 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ##### P < 0,0001 controle-F1+HFD
44 vs. hipotireoideo-F1+HFD; Φ P < 0,05 controle vs. Kp10-F1+HFD; Φ Φ P < 0,01 controle vs.
45 Kp10-F1+HFD; Φ Φ Φ P < 0,001 controle vs. Kp10-F1+HFD; Φ Φ Φ Φ P < 0,0001 controle vs.
46 Kp10-F1+HFD; α P < 0,05 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; α α α α P < 0,0001
47 controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; δ P < 0,05 controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD;
48 δ δ δ δ P < 0,0001 controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; γ P < 0,05 hipotireoideo-F1+HFD vs.

1 Kp10-F1+HFD; $\gamma \gamma P < 0,01$ hipotireoideo-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; $\gamma \gamma \gamma \gamma P < 0,0001$
2 hipotireoideo-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à
3 glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; HFD = dieta hiperlipídica; W=
4 semanas.....115

5 **Figura 6 Avaliação hepática, da adiposidade e da bioquímica plasmática da prole macho**
6 **exposta a dieta hiperlipídica de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas**
7 **com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) Concentração plasmática de triglicerídeos, Colesterol total,
8 HDL e LDL. B) Concentração plasmática de AST e ALT. C) Massa relativa do fígado. D)
9 Expressão gênica de Insr, Irs1 e mTor no fígado. E) Massa relativa do tecido adiposo
10 retroperitoneal. F) Massa relativa do tecido adiposo inguinal. G) Massa relativa do tecido
11 adiposo marrom. H) Fotomicrografia de tecido adiposo brando. I) Média da área dos adipócitos.
12 J) Distribuição relativa dos tamanhos dos adipócitos. (A-I: Anova de uma via post hoc SNK, J:
13 Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão
14 representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. HFD = dieta
15 hiperlipídica; W= semanas; BM= massa corporal; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL
16 = lipoproteína de baixa densidade; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina
17 aminotransferase.....117

18 **Figura 7 Avaliação hepática, da adiposidade e da bioquímica plasmática da prole fêmea**
19 **exposta a dieta hiperlipídica de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas**
20 **com Kisspeptina-10 (Kp10).** A) Concentração plasmática de triglicerídeos, Colesterol total,
21 HDL e LDL. B) Concentração plasmática de AST e ALT. C) Massa relativa do fígado. D)
22 Expressão gênica de Insr, Irs1 e mTor no fígado. E) Massa relativa do tecido adiposo
23 retroperitoneal. F) Massa relativa do tecido adiposo inguinal. G) Massa relativa do tecido
24 adiposo marrom. H) Fotomicrografia de tecido adiposo brando. I) Média da área dos adipócitos.
25 J) Distribuição relativa dos tamanhos dos adipócitos. (A-I: Anova de uma via post hoc SNK, J:
26 Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão
27 representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. HFD = dieta
28 hiperlipídica; W= semanas; BM= massa corporal; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL
29 = lipoproteína de baixa densidade; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina
30 aminotransferase.....119

31

32

1

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2

AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de Variância
ALT	Aspartato Amino Transferase
AST	Alanina Amino Transferase
AUC	Área Sob A Curva
cDNA	DNA complementar
CH ₃ OH	Metanol
DG	Dia Gestacional
DMG	Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNKs	Células <i>Natural Killers</i> Deciduais
DNTs	Doenças Não Transmissíveis
DOHaD	Hipótese das Origens do Desenvolvimento de Saúde e Doença
PN	Dia Pós-Natal
ER α	Receptor de estrogénio alfa
FATPS	Proteínas Transportadoras De Ácidos Graxos Da Placenta
GLUT	Transportador De Glicose
GnRH	Hormônio Liberador De Gonadotrofina
GPR54	Receptor 54 Acoplado A Proteína Gq
H ₂ O ₂	Peróxido De Hidrogênio

HCL	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta Hiperlipídica
HM	Hipotireoidismo Materno
HPG	Hipotálamo-Hipófase-Gonadal
IFN γ	Interferon-Gama
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IGF1r	Receptor de IGF1
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes a insulina
IL- 4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
INS1	Insulina
INSR	Receptor de insulina
IP	Intraperitoneal
IRS	Substrato 1 do receptor de insulina
KISS1	Kisspeptina
KISS1r	Receptor De Kisspeptina
Kp10	Kisspeptina-10
Kp234	Kisspeptina 234
LaBIO	Laboratório de Criação, Manutenção e Experimentação Animal

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LGA	Large For Gestational Age
LIF	Fator Inibitório De Leucemia
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Alvo de rapamicina em mammíferos
mTORC1	Mtor Complexo 1
NBT/BCIP	Azul nitro tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/
Nf-κB	Fator Nuclear-Kb
NLRP3	Nlr Family Pyrin Domain Containing 3
PAS	Ácido Periódico De Schiff
PBS	Solução De Fosfato Tamponada
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PL	Lactogênios Placentários
p-mTOR	mTOR fosforilado
PTU	6-Propyl-2-Thiouracil
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa
RAPTOR	Proteína reguladora associada ao mTOR
RCIU	Restrição De Crescimento Fetal Intrauterino
rPRL	Receptor de prolactina
SEM	Erro Padrão Da Média
SGA	Small For Gestational Age
SNK	Student-Newman-Keuls

T4	Tiroxina
TBS-T	Solução Tris-Salina Tamponada Com Twee-20
TGF- β	Fator De Crescimento Transformador Beta
TIMPs	Inibidores Teciduais De Metaloproteinases
Treg	Linfócitos T Regulatórios
TSC2	Complexo 2 da esclerose tuberosa
TSH	Hormônio tireoestimulante
TTIPG	Teste De Tolerância Intraperitoneal À Glicose
TTIPI	Teste De Tolerância Intraperitoneal À Insulina
UESC	Univeridade Estadual de Santa Cruz
VEGF	Fator De Crescimento Endotelial Vascular
χ^2	Qui-Quadrado

1

2

SUMÁRIO

1		
2	1.INTRODUÇÃO	26
3	2.OBJETIVO GERAL	30
4	3.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	4.REVISÃO DE LITERATURA	32
6	4.1. Programação do desenvolvimento fetal	32
7	4.1.1. Papel da placenta na programação do desenvolvimento fetal	32
8	4.2. Papel da kisspeptina na gestação	36
9	4.2.1. Células trofoblásticas.....	37
10	4.2.2. Implantação e decidualização	37
11	4.2.3. Modulação imunológica	38
12	4.2.4. Homeostase glicêmica	39
13	4.2.5. <i>Doenças gestacionais em humanos e modelos experimentais</i>	39
14	4.3. Hipotireoidismo materno	40
15	4.4. Efeitos da kisspeptina em doenças gestacionais e na programação intrauterina	
16	42	
17	5.CAPÍTULO 1	44
18	5.1. INTRODUÇÃO	46
19	5.2. MATERIAL E MÉTODOS	47
20	<i>Animais</i> 47	
21	<i>Delineamento experimental</i>	48
22	<i>Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a</i>	
23	<i>insulina (TTIPI).</i>	48
24	<i>Necropsia e coleta de material</i>	49
25	<i>Análise hormonal</i>	49
26	<i>Análise Bioquímica</i>	50
27	<i>Avaliação histomorfológica da placenta</i>	50
28	<i>Imuno-histoquímica</i>	51
29	<i>qRT-PCR</i>	52
30	<i>Análise estatística</i>	54
31	5.3. RESULTADOS	54
32	<i>O tratamento materno com Kp10 não influenciou a disfunção glicêmica e redução da</i>	
33	<i>insulina plasmática e HDL causadas pelo hipotireoidismo em ratas gestantes.</i>	54
34	<i>O tratamento materno com Kp10 não reverte comprometimento da morfologia placentária</i>	
35	<i>causada pelo hipotireoidismo em ratas</i>	58
36	<i>O tratamento materno com Kp10 melhora a desregulação em Glut1 placentária causada</i>	
37	<i>pelo hipotireoidismo em ratas</i>	61
38	<i>O hipotireoidismo materno aumenta a expressão placentária de INSRβ em ratas, enquanto</i>	
39	<i>Kp10 regula positivamente a expressão de IGF1/IGF1r.</i>	63
40	<i>O tratamento materno com Kp10 reverteu a desregulação placentária de AKT/mTOR</i>	
41	<i>causada pelo hipotireoidismo em ratas aos 14 DG</i>	65
42	5.4. DISCUSSÃO	68
43	6.CAPÍTULO 2:	73
44	6.1. INTRODUÇÃO	75
45	6.2. MATERIAL E MÉTODOS	76
46	<i>Animais</i> 76	
47	<i>Delineamento experimental</i>	76

1	<i>Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a</i>	
2	<i>insulina (TTIPI).</i>	77
3	<i>Necropsia e coleta de material</i>	77
4	<i>Análise hormonal</i>	79
5	<i>Avaliação histomorfométrica da placenta</i>	79
6	<i>Avaliação do desenvolvimento fetal</i>	79
7	<i>Imuno-histoquímica</i>	79
8	<i>qRT-PCR</i>	80
9	<i>Análise estatística</i>	81
10	6.3. RESULTADOS	82
11	<i>O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas acelerou o ganho de massa</i>	
12	<i>corporal materna e aumentou a concentração de T4 livre da geração F1 gestante.</i>	82
13	<i>O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas melhora o desenvolvimento feto-</i>	
14	<i>placentário da geração F2</i>	85
15	<i>O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão</i>	
16	<i>de rPRL na interface materno-fetal da geração F1</i>	87
17	<i>O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão</i>	
18	<i>de IGF1 na interface materno-fetal da geração F1</i>	88
19	<i>O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão</i>	
20	<i>de mTOR na interface materno-fetal da geração F1</i>	91
21	6.4. DISCUSSÃO	93
22	7. CAPÍTULO 3:	98
23	7.1. INTRODUÇÃO	100
24	7.2. MATERIAIS E MÉTODOS	102
25	<i>Animais</i>	102
26	<i>Indução do hipotireoidismo e tratamento com Kissseptina-10 (Kp10)</i>	102
27	<i>Delineamento experimental</i>	102
28	<i>Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a</i>	
29	<i>insulina (TTIPI).</i>	103
30	<i>Coleta de sangue e Dosagem de insulina e T4 livre</i>	104
31	<i>Necropsia e coleta de material</i>	104
32	<i>Análise Bioquímica</i>	104
33	<i>Histomorfometria do tecido adiposo branco</i>	105
34	<i>qRT-PCR</i>	105
35	<i>Análise estatística</i>	106
36	7.3. RESULTADOS	106
37	<i>O tratamento materno com Kp10 não afeta o aumento do período gestacional e a</i>	
38	<i>diminuição da massa corporal e dos níveis de T4 livre nos neonatos causados pelo</i>	
39	<i>hipotireoidismo materno em ratas</i>	106
40	<i>O tratamento materno com Kp10 melhora a tolerância a glicose na prole macho de ratas</i>	
41	<i>hipotireoideas, mas não afeta a resistência à insulina alterada</i>	107
42	<i>O tratamento materno com Kp10 reverte a intolerância à glicose na prole fêmea de ratas</i>	
43	<i>hipotireoideas, mas não melhora a maior resistência à insulina</i>	109
44	<i>O hipotireoidismo materno acelera o ganho de massa corporal da prole macho exposta a</i>	
45	<i>dieta hiperlipídica.</i>	111
46	<i>O tratamento materno com Kp10 retarda e reduz a intolerância à glicose decorrente da</i>	
47	<i>exposição a dieta hiperlipídica em prole fêmea de ratas hipotireoideas</i>	113
48	<i>O tratamento materno com Kp10 não é capaz de bloquear o aumento exacerbado de tecido</i>	
49	<i>adiposo inguinal causado pelo hipotireoidismo materno na prole macho exposta a dieta</i>	
50	<i>hiperlipídica</i>	116

1	<i>O tratamento materno com Kp10 não é capaz de bloquear o aumento exacerbado de tecido</i>	
2	<i>adiposo retroperitoneal e marrom causado pelo hipotireoidismo materno na prole fêmea</i>	
3	<i>exposta a dieta hiperlipídica</i>	118
4	7.4. DISCUSSÃO.....	120
5	REFERÊNCIAS.....	124
6	APENDICE A - CONTROLES NEGATIVO DO CAPÍTULO 1	139
7		
8		
9		

10 1. INTRODUÇÃO

11 De acordo com a Hipótese das Origens do Desenvolvimento de Saúde e Doença
12 (*Developmental Origins of Health and Disease hypothesis* – DOHaD), perturbações no
13 ambiente intrauterino afetam a fisiologia fetal e podem predispor a prole a doenças crônicas na
14 vida adulta como obesidade, diabetes e hipertensão, devido a alterações nos mecanismos
15 regulatórios homeostáticos do feto. Por isso, o metabolismo materno e placentário adequados
16 são determinantes para a programação metabólica fetal e a saúde pós-natal (BARKER et al.,
17 1990; BURTON et al., 2010).

18 O hipotireoidismo materno é um importante distúrbio cardiometabólico que
19 compromete a gestação e o ambiente intrauterino, podendo acarretar diversos problemas à
20 saúde da mãe, do feto e na vida adulta da prole (BAGHERIPUOR et al., 2015; KEMKEM et
21 al., 2020; KURLAK et al., 2013; LIU et al., 2019; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018;
22 TAPIA-MARTÍNEZ et al., 2019). Mulheres com hipotireoidismo, além de apresentarem
23 disfunção na interface materno-fetal, apresentam histórico de abortos recorrentes e
24 complicações durante o período pré-natal, como pré-eclâmpsia, descolamento de placenta,
25 parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e maior risco de diabetes *mellitus*
26 gestacional (DMG) (BIONDI; KAHALY; ROBERTSON, 2019; GONG; LIU; LIU, 2016;
27 SHRESTHA; TRIPATHI; DONGOL, 2019; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; WANG
28 et al., 2021b). Além disso, o hipotireoidismo materno altera a programação metabólica fetal,
29 uma vez que aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 na vida adulta
30 (BAGHERIPUOR et al., 2015; KEMKEM et al., 2020; LIU et al., 2019; TAPIA-MARTÍNEZ
31 et al., 2019).

32 O desenvolvimento adequado do feto e sua programação intrauterina dependem da
33 função adequada da placenta, órgão chave na gestação, uma vez que hormônios placentários
34 como progesterona, estrogênio, lactogênio placentário (PL), prolactina, leptina e cortisol são
35 fundamentais para as adaptações metabólicas maternas. Essas adaptações são necessárias para
36 acomodar as necessidades do feto, preparar para a lactação subsequente e cuidar do recém-
37 nascido (NEWBERN; FREEMARK, 2011). Para isso, o estabelecimento adequado do eixo
38 placenta-pâncreas é necessário para permitir a maior liberação de insulina e processos
39 adaptativos das células β pancreáticas, visando compensar a resistência à insulina periférica
40 estabelecida ao longo da gestação e fornecer ao feto os nutrientes necessários para o seu
41 desenvolvimento (FOWDEN et al., 2008; NEWBERN; FREEMARK, 2011; SZLAPINSKI;
42 HILL, 2020). No entanto, estudos recentes sugerem que a kisspeptina pode ser o hormônio

43 regulador chave do eixo placenta-pâncreas e, conseqüentemente, do metabolismo materno
44 (BOWE et al., 2019; MUSA; MATJILA; LEVITT, 2021; SZLAPINSKI; HILL, 2020;
45 VELASCO et al., 2019).

46 A kisspeptina, codificada pelo gene *Kiss1*, é conhecida pelo seu papel chave na
47 regulação da fertilidade, uma vez que estimula a liberação hipotalâmica do hormônio liberador
48 de gonadotrofina (GnRH) através do seu receptor Kiss1R e, conseqüentemente, a função
49 gonadal (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003). Além de sua expressão central, o
50 sistema Kiss1/Kiss1R é expresso em outros órgãos e tecidos como no ovário (CASTELLANO
51 et al., 2006), testículo (DUDEK et al., 2016), coração (MAGUIRE et al., 2011) e tecido adiposo
52 (DUDEK et al., 2016). No entanto, estudos sugerem a placenta como a principal fonte da
53 kisspeptina sistêmica durante a gestação (HORIKOSHI et al., 2003), uma vez que os níveis
54 plasmáticos e urinários de kisspeptina em mulheres estão intensamente aumentados no terço
55 final da gestação, com queda abrupta após o parto (HORIKOSHI et al., 2003; JAYASENA et
56 al., 2015). Por isso, o uso da kisspeptina como biomarcador sérico tem sido sugerido como um
57 indicador do sucesso gestacional (MUSA et al., 2021), uma vez que doenças gestacionais
58 cardiometabólicas como pré-eclâmpsia, obesidade e DMG estão associadas a alterações nos
59 níveis plasmáticos e/ou placentários de kisspeptina (ĆETKOVIĆ et al., 2012; KAPUSTIN et
60 al., 2020; KOŁODZIEJSKI et al., 2018; LOGIE et al., 2012). Além disso, estudo recente do
61 nosso grupo de pesquisa demonstrou que a restrição de crescimento fetal causada pelo
62 hipotireoidismo em ratas está associada a uma redução da expressão do sistema Kiss1/Kiss1R
63 na interface materno-fetal (SANTOS et al., 2022b), sendo que o tratamento com kisspeptina foi
64 capaz de melhorar o ambiente intrauterino e o desenvolvimento fetal em ratas hipotireoideas
65 (SANTOS et al., 2022c, 2023a). Por isso, uma hipótese deste estudo é que a kisspeptina pode
66 ser um hormônio chave que controla o metabolismo materno e placentário e o crescimento fetal.

67 Estudos também já demonstraram que a kisspeptina é capaz de modular a liberação de
68 insulina e estimular a adaptação das células β pancreáticas durante a gestação (BOWE et al.,
69 2019; HAUGE-EVANS et al., 2006; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; MUSA; MATJILA;
70 LEVITT, 2021; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014; SONG et al., 2014; SZLAPINSKI;
71 HILL, 2020; TOLSON et al., 2014; VELASCO et al., 2019; VIKMAN; AHRÉN, 2009;
72 WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011), sugerindo que a redução na produção de kisspeptina pela
73 placenta pode resultar em comprometimento no metabolismo glicêmico materno e fetal, e ser
74 um fator para o desenvolvimento de diabetes gestacional (BOWE et al., 2019; IZZI-
75 ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019; SZLAPINSKI; HILL, 2020). Assim, considerando que o
76 hipotireoidismo materno compromete a homeostase glicêmica materna (KENT; ATLURI;

77 CUFFE, 2022) e da prole (BAGHERIPUOR et al., 2015; KEMKEM et al., 2020; LIU et al.,
78 2019; TAPIA-MARTÍNEZ et al., 2019) e reduz a expressão placentária de kisspeptina
79 (SANTOS et al., 2022b), outra hipótese deste estudo é de que o tratamento com kisspeptina em
80 ratas gestantes hipotireoideas pode não somente melhorar a tolerância glicêmica materna, como
81 também a tolerância glicêmica da prole.

82 Uma das principais vias reguladoras da liberação de insulina e proliferação das células
83 β pancreáticas é a sinalização IRS/PI3K/AKT/mTOR, que atua como um sensor nas células
84 placentárias quando expostas ao oxigênio e nutrientes (AKHAPHONG et al., 2021;
85 BALCAZAR et al., 2009; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; YOON, 2017). Desse
86 modo, considerando que a administração exógena de kisspeptina estimula a ativação de mTOR
87 em células epiteliais mamárias bovinas (CAO et al., 2021) e aumenta a expressão de IRS-1 e
88 PI3K em linhagem de células GT1-7 (YUAN et al., 2021), outra hipótese deste estudo é que a
89 kisspeptina estimula a ativação da via de sinalização IRS/PI3K/AKT/mTOR na placenta. Até o
90 momento não há estudos que tenham avaliado o papel da kisspeptina na expressão de mTOR
91 placentário, inclusive em doenças gestacionais.

92 Estudos já mostraram que falhas na sinalização IRS/PI3K/AKT/mTOR acarreta
93 alterações morfofisiológicas na placenta, estando associada à restrição de crescimento
94 intrauterino, obesidade, diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (AKHAPHONG et al., 2021;
95 BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; TSAI et al., 2021). No entanto, ainda é
96 desconhecido se a alteração dessa via de sinalização está envolvida na disfunção placentária
97 causada pelo hipotireoidismo materno. Além disso, falhas na sinalização placentária de mTOR
98 também está associada a doenças crônicas na prole (BURTON; FOWDEN; THORNBURG,
99 2016). Um estudo recente demonstrou que a prole de camundongos nocautes para mTOR na
100 placenta e submetida a dieta hiperlipídica desenvolveu obesidade, resistência à insulina e falha
101 na resposta compensadora das células β pancreáticas. Por outro lado, a prole de nocautes para
102 TSC2 placentário, inibidor de mTOR, apresentou resistência ao desenvolvimento de obesidade
103 e melhora na tolerância à glicose em resposta a dieta hiperlipídica, sugerindo que o mTOR
104 complexo 1 (mTORC1) placentário serve como um elo mecanístico entre a função placentária
105 e a programação da obesidade e da resistência à insulina na prole adulta (AKHAPHONG et al.,
106 2021). Com isso, outra hipótese deste estudo é que o hipotireoidismo materno compromete a
107 sinalização de mTORC1 placentário afetando não somente o metabolismo placentário como a
108 programação metabólica fetal, enquanto a kisspeptina é capaz de reverter essa alteração.

109 Este estudo permitiu uma melhor compreensão do papel modulatório da kisspeptina nas
110 alterações metabólicas glicêmicas e placentárias causadas pelo hipotireoidismo materno,

111 inclusive em relação à programação metabólica fetal. Além disso, sugeriu a kisspeptina como
112 estratégia terapêutica em uma doença metabólica gestacional com restrição de crescimento fetal
113 e seu efeito protetor contra disfunção metabólica na prole em idade adulta.

114

115 2. OBJETIVO GERAL

- 116 • Avaliar o papel modulatório de kisspeptina na homeostase glicêmica e eixo placenta-
117 pâncreas em ratas com hipotireoidismo materno e seu impacto na programação
118 metabólica glicêmica da prole.

120 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

121 CAPÍTULO 1:

- 122 • Avaliar o efeito de kisspeptina na homeostase energética materna em ratas com
123 hipotireoidismo materno;
- 124 • Avaliar o efeito de kisspeptina na expressão gênica e/ou proteica de mediadores da
125 homeostase glicêmica (INSR, IRS-1, IGF1R, IGF1, AKT, mTORC1, RAPTOR,
126 GLUT1) na placenta de ratas hipotireoideas;
- 127 • Avaliar o efeito de kisspeptina na expressão gênica e/ou proteica de mediadores do eixo
128 placenta-pâncreas (rPRL, PL-II e Leptina) na placenta de ratas hipotireoideas;
- 129 • Avaliar o efeito de kisspeptina na quantidade (imunomarcção de INS1) de ilhotas
130 pancreáticas em ratas gestantes hipotireoideas;

131 CAPÍTULO 2:

- 132 • Avaliar a homeostase glicêmica materna na geração F1 gestante provenientes de ratas
133 com hipotireoidismo materno e tratadas com kisspeptina;
- 134 • Avaliar o desenvolvimento feto-placentário da prole de fêmeas F1 provenientes de ratas
135 com hipotireoidismo materno e tratadas com kisspeptina;
- 136 • Avaliar o efeito de kisspeptina na expressão gênica e/ou proteica de mediadores da
137 homeostase glicêmica (INSR, IRS-1, IGF1R, IGF1, AKT, mTORC1, RAPTOR,
138 GLUT1) na interface materno-fetal da prole de fêmeas F1 gestante provenientes de ratas
139 com hipotireoidismo materno e tratadas com kisspeptina;
- 140 • Avaliar o efeito de kisspeptina na expressão gênica e/ou proteica de mediadores do eixo
141 placenta-pâncreas (rPRL, PL-II e Leptina) na interface materno-fetal da prole de fêmeas
142 F1 provenientes de ratas com hipotireoidismo materno e tratadas com kisspeptina;

143 CAPÍTULO 3:

- 144 • Avaliar o efeito da administração materna de kisspeptina na homeostase energética
145 antes e após exposição a dieta hiperlipídica na prole (machos e fêmeas) de ratas
146 hipotireoideas;
- 147 • Avaliar o efeito da administração materna de kisspeptina na adiposidade da prole

- 148 (machos e fêmeas) de ratas hipotireoideas após exposição a dieta hiperlipídica;
- 149 • Avaliar o efeito da administração materna de kisspeptina na função hepática da prole
- 150 (machos e fêmeas) de ratas hipotireoideas após exposição a dieta hiperlipídica;
- 151 • Avaliar o efeito da administração materna de kisspeptina na expressão gênica hepática
- 152 de mediadores da homeostase glicêmica (*Insr*, *Irs-1* e *mTor*) da prole (machos e
- 153 fêmeas) de ratas hipotireoideas após exposição a dieta hiperlipídica;
- 154
- 155

156 4. REVISÃO DE LITERATURA

157

158 4.1. Programação do desenvolvimento fetal

159 Doenças não transmissíveis (DNTs) são responsáveis por 74% das mortes no mundo
160 (WHO, 2022). De acordo com a Hipótese das Origens do Desenvolvimento de Saúde e Doença
161 (*Developmental Origins of Health and Disease hypothesis – DOHaD*), alterações em pontos-
162 chaves do desenvolvimento resultante de uma combinação multifatorial de influências
163 ambientais, metabólicas e comportamentais, comprometem o adequado funcionamento da
164 placenta. Estas alterações estão associadas ao desenvolvimento de doenças gestacionais e falhas
165 na programação do desenvolvimento, aumentando o risco de doenças crônicas durante a vida
166 adulta. Por isso, o metabolismo materno e placentário são fatores determinantes para a
167 programação metabólica fetal e a saúde pós-natal (GLUCKMAN; HANSON, 2004; KRAMER
168 et al., 2023; REN; JIN; ZHU, 2023; SAAVEDRA et al., 2023).

169 Fatores externos ao ambiente intrauterino, associados principalmente ao ambiente,
170 metabolismo e estilo de vida materno, são um dos principais moduladores da programação
171 metabólica fetal (KRAMER et al., 2023; NAPSO et al., 2018). Embora ainda existam muitas
172 lacunas a serem preenchidas no estudo da influência materna sobre a programação do
173 desenvolvimento, propõe-se que perturbações ambientais, comportamentais e/ou no estilo de
174 vida materno são sinalizadores para alterações no epigenoma materno e fetal. Essas alterações
175 modificam a expressão gênica de hormônios, fatores de crescimento e demais proteínas que
176 coordenam o perfeito funcionamento do ambiente placentário, comprometendo assim a
177 programação do desenvolvimento fetal (CHAVATTE-PALMER; COUTURIER-TARRADE;
178 ROUSSEAU-RALLIARD, 2023; CHRISTOFOROU; SFERRUZZI-PERRI, 2020;
179 HOFFMAN et al., 2021; KRAMER et al., 2023; SAAVEDRA et al., 2023; YAO; LOPEZ-
180 TELLO; SFERRUZZI-PERRI, 2021).

181 Assim, a compreensão do mecanismo pelos quais essas moléculas atuam não só permite
182 melhor entendimento da patofisiologia das doenças gestacionais, como também serve para o
183 mapeamento de alvos para potenciais ferramentas terapêuticas para doenças gestacionais e que
184 aumentem a resistência fetal ao desenvolvimento de doenças crônicas (HOFFMAN et al., 2021;
185 KRAMER et al., 2023).

186

187 4.1.1. Papel da placenta na programação do desenvolvimento fetal

188 A placenta é o elo entre a mãe e o feto e o principal órgão regulador do ambiente
189 intrauterino, desempenhando um papel fundamental na resposta às mudanças ambientais. Ela

190 possui alta plasticidade em resposta a insultos, visando a manutenção da nutrição e crescimento
191 fetal. No entanto, quando o limiar adaptativo da placenta é ultrapassado devido a mudanças
192 ambientais, exposição a substâncias químicas, alterações psicossociais e estilo de vida materno,
193 pode ocorrer comprometimento da função placentária. Isso afeta a atividade endócrina e as
194 trocas de nutrientes, comprometendo o crescimento e o desenvolvimento fetal, bem como a
195 programação metabólica fetal (FOWDEN et al., 2008; LAPEHN; PAQUETTE, 2022;
196 SFERRUZZI-PERRI; LOPEZ-TELLO; SALAZAR-PETRES, 2022; SHAO et al., 2022).

197 A interação das células trofoblásticas com a fisiologia materna, mediada pela interface
198 materno-fetal, resulta em um controle placentário do desenvolvimento intrauterino,
199 principalmente por meio de suas funções endócrinas e de transporte de nutrientes. Desta forma,
200 falhas na diferenciação e função placentária estão associadas ao surgimento de doenças
201 gestacionais e ao comprometimento do desenvolvimento e crescimento fetal (FOWDEN et al.,
202 2008; HOFFMAN et al., 2021; SHAO et al., 2022).

203

204 *a) Placenta e o Transporte de nutrientes*

205 Durante o desenvolvimento embrionário, a placenta, um órgão metabolicamente ativo,
206 demanda um drástico aumento no metabolismo energético materno para promover o
207 crescimento feto-placentário de maneira adequada. Essa maior necessidade energética é uma
208 resposta a manutenção do transporte ativo de nutrientes e à síntese proteica, o que resulta em
209 maior consumo de oxigênio e outros nutrientes. Dito isso, o estabelecimento da rede vascular
210 placentária e a manutenção do fluxo sanguíneo na interface materno fetal são fundamentais para
211 esse processo (BRETT et al., 2014; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; REYNOLDS
212 et al., 2023; SHAO et al., 2022).

213 Para garantir o fluxo sanguíneo placentário adequado é essencial o remodelamento
214 vascular, onde o endotélio vascular temporariamente cede lugar às células trofoblásticas,
215 resultando em um lúmen dilatado e aumento do fluxo sanguíneo (SOARES et al., 2014;
216 WHITLEY; CARTWRIGHT, 2010). Além disso, o aumento da superfície de contato da
217 placenta devido à invasão trofoblástica e expansão das microvilosidades, é crucial para
218 assegurar o tráfego eficiente de nutrientes entre mãe e feto (SHAO et al., 2022). Dessa forma,
219 doenças gestacionais, principalmente pré-eclâmpsia, que cursam com falha na migração
220 trofoblástica e consequente remodelamento vascular ineficiente, resultam em hipóxia
221 placentária e comprometimento do fluxo de nutrientes para o feto, podendo levar a restrição de
222 crescimento fetal intrauterino (RCIU) (APLIN et al., 2020; BURTON et al., 2019).

223 O fluxo sanguíneo placentário adequado permite o trânsito de nutrientes entre mãe e
224 feto. A placenta realiza a entrega de macromoléculas ao feto enquanto devolve detrito à corrente
225 sanguínea materna. Esse processo é mediado por uma série de transportadores transmembrana,
226 principalmente os transportadores de glicose (GLUTs 1,2,4,8,9,10 e 12) e aminoácidos
227 (Sistema A, Sistema B e Sistema L), enquanto o transporte de lipídeos ocorre por meio de
228 lipoproteínas e proteínas transportadoras de ácidos graxos da placenta (FATPs) e a translocase
229 de ácidos graxos (CD36) (BRETT et al., 2014; SHAO et al., 2022).

230 O suprimento de nutrientes maternos para as demandas fetais está intimamente ligado
231 ao *status* nutricional da mãe, com a via de sinalização mTOR desempenhando um papel crucial.
232 Esta via capta as flutuações de nutrientes, como glicose, aminoácidos e oxigênio, e regula o
233 crescimento fetal e placentário (BRETT et al., 2014; BURTON; FOWDEN; THORNBURG,
234 2016). As vias de sinalização placentária de mTOR coordenam a plasticidade placentária,
235 regulando o ambiente nutricional, a diferenciação trofoblástica e o metabolismo celular. Em
236 resposta a estressores, essa via ativa mecanismos adaptativos que visam a manutenção da
237 função placentária e o crescimento fetal (HOFFMAN et al., 2021; SHAO et al., 2022).

238 Disfunções placentárias, que levam à redução do transporte de nutrientes para o feto,
239 resultam na diminuição da atividade do mTOR, o que, por sua vez, está associada à redução do
240 peso fetal (BEETCH; ALEJANDRO, 2021). Além disso, estudos sugerem uma relação direta
241 entre a desregulação da via mTOR e a programação metabólica da prole. Camundongos
242 *knockout* para mTOR placentário mostram redução tanto no peso fetal quanto placentário, além
243 de maior sensibilidade à indução de obesidade por dieta hiperlipídica e disfunção metabólica.
244 Em contraste, a depleção de TSC2, bloqueador natural de mTOR, não resulta em alterações no
245 peso fetal ou placentário e protegeu a prole contra o desenvolvimento de obesidade por dieta
246 hiperlipídica (AKHAPHONG et al., 2021).

247 Dessa forma, o transporte placentário de nutrientes pode ser comprometido por
248 alterações na morfologia da placenta, no fluxo sanguíneo, na expressão dos transportadores
249 transmembrana e/ou na via de sinalização de mTOR, o que leva a um maior risco de doenças
250 crônicas na vida adulta (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; HOFFMAN et al., 2021;
251 WINTERHAGER; GELLHAUS, 2017).

252

253 *b) Função Endócrina placentária*

254 Durante a gestação, o corpo da mãe sofre adaptações cardiorrespiratórias, imunes e
255 metabólicas que resultam em alterações funcionais e morfológicas nos órgãos maternos. Essas

256 alterações permitem o suprimento adequado de gases, nutrientes e metabólitos para o feto,
257 necessários para o seu crescimento e desenvolvimento, além de possibilitar a lactação e cuidado
258 materno com o recém-nascido (FOWDEN et al., 2008; NEWBERN; FREEMARK, 2011).
259 Essas adaptações são moduladas pela ação dos hormônios placentários e dentre eles estão: a
260 família dos hormônios do crescimento e prolactinas (prolactina, lactogênios placentários e
261 hormônio do crescimento), hormônios esteroides (estrógeno e progesterona) e peptídeos
262 (serotonina, melatonina, oxitocina e kisspeptina). Alterações nesses hormônios estão associadas
263 a diversas complicações gestacionais e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida pós-
264 natal da prole (KRAMER et al., 2023; NAPSO et al., 2018; SZLAPINSKI; HILL, 2020).

265 A família das prolactinas e lactogênios placentários atuam principalmente na regulação
266 materna do metabolismo da glicose, causando um aumento na massa de células β -pancreáticas,
267 nos níveis plasmáticos de glicose e na resistência à insulina, visando prover maior aporte de
268 glicose ao feto. Além disso, esses hormônios estão associados ao desenvolvimento da glândula
269 mamária e lactação, bem como mudanças no comportamento materno direcionados para o
270 cuidado, amamentação e proteção da prole (NAPSO et al., 2018). Semelhantemente, os
271 hormônios esteroides, estrógeno e progesterona, que durante a gestação são secretados
272 majoritariamente pela placenta, também atuam na regulação do metabolismo glicêmico e de
273 lipídeos, regulação da apoptose em células β -pancreáticas, e regulação do apetite materno e do
274 sistema cardiovascular materno (NAPSO et al., 2018; NEWBERN; FREEMARK, 2011;
275 SZLAPINSKI; HILL, 2020).

276 Estudos demonstraram que peptídeos como melatonina e seu precursor serotonina, são
277 sintetizados pela placenta e que também atuam na regulação do metabolismo e comportamento
278 materno. Estudos sugerem que a melatonina seja um importante regulador do comportamento
279 materno, visto que sua deficiência em camundongos *knockout* para enzima triptofano
280 hidroxilase 2, resultou em comportamento agressivo, diminuição da proteção do filhote e
281 aumento do canibalismo. No entanto, os estudos sobre a suplementação de melatonina na
282 gestação e seu impacto na saúde materna, fetal e pós-natal ainda não são conclusivos (ANGOÁ-
283 PÉREZ et al., 2014; NAPSO et al., 2018; SZLAPINSKI; HILL, 2020).

284 A oxitocina é outro importante peptídeo associado principalmente ao processo de parto,
285 uma vez que estimula as contrações uterinas. No entanto, ela também é importante para o
286 estabelecimento do elo afetivo entre a mãe e o filho, bem como estimular a habilidade materna
287 pós-natal (NAPSO et al., 2018). Outro hormônio neuroativo produzido pela placenta é a
288 kisspeptina, que tem sido atualmente considerada um biomarcador de sucesso gestacional e
289 crescimento fetal. Pesquisas já mostraram que a kisspeptina influencia os processos de

290 implantação e placentação, como também o metabolismo glicêmico materno e o eixo placenta-
291 pâncreas (BOWE et al., 2019; HU et al., 2019; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; MARK et al.,
292 2013; MUSA; MATJILA; LEVITT, 2021; SZLAPINSKI; HILL, 2020; TSOUTSOUKI et al.,
293 2022).

294

295 **4.2. Papel da kisspeptina na gestação**

296 A kisspeptina é um peptídeo codificado pelo gene *KISS1*, que atua via o receptor 54
297 acoplado a proteína Gq (GPR54), também conhecido como KISS1R, codificado pelo gene
298 *KISS1R*, que juntos possuem papéis cruciais em vários processos fisiológicos (KOTANI et al.,
299 2001; NAVARRO, 2020; OHTAKI et al., 2001). Inicialmente descrito como gene supressor de
300 metástase tumoral (LEE et al., 1996; OHTAKI et al., 2001), a kisspeptina ganhou destaque por
301 sua atividade reguladora no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, sendo considerada o
302 neuropeptídeo chave da reprodução (DE ROUX et al., 2003; ROA; TENA-SEMPERE, 2007;
303 SEMINARA et al., 2003). No entanto, outras funcionalidades da kisspeptina vêm sendo
304 exploradas. Estudos tem sugerido e demonstrado a sua participação em diversas etapas da
305 gestação, como na implantação e decidualização, além da regulação da homeostase glicêmica
306 materna (BOWE et al., 2019; REYNOLDS et al., 2009; SZYDEŁKO-GORZKOWICZ et al.,
307 2022; TSOUTSOUKI et al., 2022) e do equilíbrio energético (HUDSON; KAUFFMAN, 2021;
308 IZZI-ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019; NAVARRO, 2020).

309 O sistema Kisspeptina/Kiss1R é expresso em diversos órgãos como coração, tecido
310 adiposo, pâncreas, fígado, intestino delgado, testículo, ovário, linfonodo e vasos sanguíneos
311 (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001; REYNOLDS et al., 2009). Contudo, sugere-se
312 que a placenta seja a principal fonte da kisspeptina sistêmica em mulheres gestantes, uma vez
313 que os genes *KISS1* e *KISS1R* são altamente expressos no tecido placentário (OHTAKI et al.,
314 2001) e durante a gestação os níveis de kisspeptina no plasma e urina aumentam drasticamente,
315 cerca de 7000 e 200 vezes, respectivamente, quando comparado ao estado não gestacional,
316 reduzindo abruptamente após o parto (HORIKOSHI et al., 2003; JAYASENA et al., 2015). Por
317 isso, devido a esse aumento fisiológico acentuado da kisspeptina ao longo da gestação e redução
318 da sua concentração plasmática ser associada a RCIU, ela tem sido considerada um biomarcador
319 do sucesso gestacional (SZYDEŁKO-GORZKOWICZ et al., 2022; TSOUTSOUKI et al.,
320 2022).

321

322 4.2.1. Células trofoblásticas

323 Na placenta de mulheres e ratas, o sistema Kiss1/Kiss1R é expresso no
324 sinciciotrofoblasto, e células gigantes trofoblásticas e espongiotrofoblastos, respectivamente.
325 Essas células apresentam alta atividade endócrina e são responsáveis pela secreção da maioria
326 dos hormônios placentários e fatores de crescimento que modulam o metabolismo materno e
327 desenvolvimento placentário, bem como o crescimento e desenvolvimento fetal (BILBAN et
328 al., 2004; HORIKOSHI et al., 2003; SANTOS et al., 2022b; SILVA; SERAKIDES, 2016;
329 TERAQ et al., 2004). Por isso, sugere-se que a kisspeptina tenha um papel-chave na regulação
330 do metabolismo e desenvolvimento placentário (SANTOS et al., 2022b).

331 Os primeiros estudos a avaliar o papel da kisspeptina na gestação demonstraram a sua
332 capacidade em reduzir a migração e invasão *in vitro* de células trofoblásticas, modulando
333 negativamente a expressão de metaloproteinases e fator de crescimento endotelial vascular A
334 (VEGF-A), além de aumentar a expressão dos inibidores teciduais de metaloproteinases
335 (TIMPs) (BILBAN et al., 2004; FRANCIS et al., 2014), sugerindo um papel regulador na
336 migração e invasão trofoblástica.

337

338 4.2.2. Implantação e decidualização

339 Estudos tem demonstrado o papel da kisspeptina no processo de decidualização e
340 implantação embrionária, não somente em camundongos (SCHAEFER et al., 2021; CALDER
341 et al., 2014; ZHANG et al., 2014; ABDELKAREEM et al., 2023) como também em mulheres
342 (BABA et al., 2015), sendo que kisspeptina estimula a expressão do fator inibitório de leucemia
343 (LIF) pelas glândulas endometriais, fator crucial para a implantação do embrião
344 (ABDELKAREEM et al., 2023; CALDER et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Por isso, a
345 deleção de *Kiss1r* no útero de camundongos resulta em falhas na implantação embrionária,
346 redução do tamanho da ninhada e aumento da mortalidade neonatal (SCHAEFER et al., 2021),
347 sendo que animais *knockout* para *Kiss1* continuam a apresentar infertilidade mesmo com
348 reposição de gonadotrofinas (CALDER et al., 2014). Além disso, *Kiss1r* regula negativamente
349 a expressão uterina de ER α , de modo que falhas na expressão uterina de *Kiss1r* causa
350 hiperexpressão do receptor de estrógeno e, conseqüentemente, altera a receptividade
351 endometrial (SCHAEFER et al., 2021).

352 Estudos *in vitro* com células estromais deciduais de humanos demonstraram que a
353 kisspeptina reduz a sua migração e invasão, enquanto a administração de um antagonista do seu

354 receptor, Kp234, estimulou a sua migração e invasão (WU et al., 2019). Isso sugere que esse
355 peptídeo pode regular a migração dessas células durante a decidualização. Além disso, redução
356 da sinalização *in vitro* de kisspeptina compromete a decidualização de células estromais
357 uterinas de camundongo (ZHANG et al., 2014), sendo que camundongos *knockout* para *Kiss1*
358 ou seu receptor, mas com restauração genética da sinalização de kisspeptina nos neurônios
359 GnRH, apresentam falhas na adenogênese e função das glândulas uterinas (LEÓN et al., 2016).

360

361 4.2.3. Modulação imunológica

362 Estudos também sugerem que a kisspeptina tem capacidade de modular a atividade das
363 células *natural killers* deciduais (dNKs) e a tolerância imunológica durante a gestação
364 (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2020). As células dNKs pertencem ao sistema imune materno e
365 podem ser diferenciadas a partir de células progenitoras hematopoiéticas sob estímulo de
366 interleucina-15 (IL-15). No entanto, apresentam funções e fenótipo distintos das células NKs
367 circulantes (WANG et al., 2021a). Na interface materno-fetal, as células dNKs se acumulam na
368 decídua, mantendo relação próxima com as artérias espiraladas. Elas auxiliam no
369 estabelecimento do fenótipo pseudoendotelial do trofoblasto invasivo, além de ajudar na
370 degradação da túnica média das artérias por mecanismos ainda pouco conhecidos. Todo esse
371 processo permite o remodelamento vascular uterino pelos trofoblastos invasivos e,
372 consequentemente, maior fluxo sanguíneo para a interface materno-fetal e para o embrião/feto
373 em desenvolvimento, tornando as células dNKs fundamentais para manutenção da gestação
374 (SHARMA; GODBOLE; MODI, 2016; SOARES et al., 2014).

375 Dessa forma, estudos *in vitro* demonstraram que kisspeptina estimula a diferenciação
376 das NKs tipo 1 isoladas do sangue periférico de mulheres não-gestantes em células NKs tipo 3,
377 suprimindo a expressão de interleucina-4 (IL-4), interleucina -10 (IL-10) e interferon-gama
378 (IFN γ) e aumentando a produção do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), um
379 facilitador da transformação das células NKs periféricas em células NKs deciduais
380 (SHIRSHEV et al., 2015). Também foi demonstrado *in vitro* que kisspeptina em células
381 mononucleares do sangue periférico de mulheres hígdas favorece a formação de linfócitos T
382 regulatórios (Treg) em detrimento dos linfócitos T17, com aumento da produção de IL-10 e
383 redução de interleucina -17 (IL-17), sugerindo que a kisspeptina possa contribuir para a
384 formação da tolerância imunológica na interface materno-fetal durante a gestação
385 (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

386

387 4.2.4. Homeostase glicêmica

388 Estudos mais recentes demonstraram o papel da kisspeptina na regulação da homeostase
389 glicêmica gestacional. O bloqueio farmacológico de kisspeptina usando Kp234 ou deleção de
390 *Kiss1r* em camundongos gestantes resultou em comprometimento da tolerância à glicose,
391 acompanhado de redução da secreção de insulina sob estímulo da glicose, além de reduzir a
392 proliferação de células β pancreáticas (BOWE et al., 2019), importante mecanismo adaptativo
393 gestacional para manutenção da homeostase glicêmica durante a gestação (SZLAPINSKI;
394 HILL, 2020). O mesmo estudo verificou correlação positiva entre altos níveis plasmáticos de
395 kisspeptina e o aumento da secreção de insulina sob estímulo da glicose, e demonstrou redução
396 dos níveis plasmáticos de kisspeptina em mulheres com Diabetes *mellitus* gestacional (DMG)
397 (BOWE et al., 2019).

398

399 4.2.5. Doenças gestacionais em humanos e modelos experimentais

400 Além dos papéis sugeridos da kisspeptina no estabelecimento e manutenção da
401 gestação, estudos também têm atribuído a kisspeptina como potencial biomarcador sérico de
402 sucesso gestacional (HU et al., 2019; SULLIVAN-PYKE et al., 2018; TSOUTSOUKI et al.,
403 2022), uma vez que redução dos níveis plasmáticos de kisspeptina tem sido associada à
404 ocorrência de pré-eclâmpsia (ADALI et al., 2012; ARMSTRONG et al., 2009; ĆETKOVIĆ et
405 al., 2012; IBANOGLU et al., 2022; MATJILA et al., 2016; ZIYARAA; HAMDAN; MOUSA,
406 2016), com reduções mais expressivas em quadros severos (ZIYARAA; HAMDAN; MOUSA,
407 2016) ou quando acompanhado de outra doença gestacional como obesidade (LOGIE et al.,
408 2012). Além disso, doenças cardiometabólicas gestacionais como obesidade (LOGIE et al.,
409 2012) e DMG (BOWE et al., 2019; ĆETKOVIĆ et al., 2012), e complicações fetais como
410 nascimento de neonatos com baixo peso para a idade gestacional (SGA – *Small for Gestational*
411 *Age*) (SMETS et al., 2008) e/ou com RCIU (ARMSTRONG et al., 2009), também estão
412 associadas com redução dos níveis plasmáticos de kisspeptina.

413 Em casos de pré-eclâmpsia (CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; KAPUSTIN et al.,
414 2020; MATJILA et al., 2016; ZHANG et al., 2011) e DMG (KAPUSTIN et al., 2020), foi
415 observado também alterações na expressão gênica e/ou proteica do sistema Kiss1/Kiss1r em
416 placentas a termo. No entanto, não está claro ainda a influência da expressão gênica e/ou
417 proteica placentária de Kiss1/Kiss1r na kisspeptina circulante.

418 Curiosamente, estudos em placentas *knockout* para *Kiss1* ou *Grp54* em camundongos
419 demonstraram ausência de alterações no peso fetal e placentário (HERREBOUDT et al., 2015;
420 PANTING et al., 2024). Contudo, em modelo murino de aborto espontâneo, foi demonstrado
421 redução da expressão gênica e proteica placentária de kisspeptina, e que o bloqueio
422 farmacológico de Kiss1R resultou em alterações semelhantes ao modelo de aborto espontâneo
423 recorrente. O tratamento com kisspeptina-10 (Kp10), por outro lado, foi capaz de reduzir a taxa
424 de reabsorção embrionária (YANG et al., 2024; ZHANG et al., 2023). Estudos também
425 demonstraram redução da expressão placentária de *Kiss1* e *Kiss1r/Kiss1r* em modelo
426 experimental de hipotireoidismo materno (SANTOS et al., 2022b), e que o tratamento materno
427 com Kp10 foi capaz de melhorar o ambiente intrauterino e a RCIU (SANTOS et al., 2022c,
428 2023a). Assim, em conjunto, esses estudos sugerem que apesar da kisspeptina placentária não
429 ser vital para a ocorrência da gestação em camundongos, a sua modulação sistêmica e/ou local
430 pode ser necessária para as adaptações maternas gestacionais e a programação fetal adequada.

431

432 **4.3. Hipotireoidismo materno**

433 Durante a gestação há aumento da demanda dos hormônios tireoidianos para acomodar
434 as demandas fisiológicas materna e fetal, uma vez que os hormônios tireoidianos desempenham
435 um papel crucial na placenta, regulando o crescimento e o desenvolvimento fetal. Dessa forma,
436 os hormônios tireoidianos são capazes de agir de forma direta no tecido placentário através de
437 receptores nucleares e de forma indireta por meio da interação com outros hormônios e fatores
438 de crescimento como estrógeno, progesterona e fatores de crescimento semelhantes a insulina
439 (IGFs) (CARVALHO et al., 2022; CHEN; CHEN; LIN, 2015; SILVA; OCARINO;
440 SERAKIDES, 2018). Além disso, os hormônios tireoidianos maternos também exercem efeitos
441 sobre os tecidos fetais durante a 6-12ª semana de gestação em humanos e até o 17º dia de
442 gestação na rata, sendo capazes de modular o desenvolvimento e maturação dos órgãos fetais,
443 bem como do metabolismo fetal até que o feto seja capaz de produzir seus próprios hormônios
444 tireoidianos (CHEN; CHEN; LIN, 2015; FORHEAD; FOWDEN, 2014; JAMES;
445 FRANKLYN; KILBY, 2007; SILVA; SERAKIDES, 2016).

446 Com isso, a desregulação da sinalização materna dos hormônios tireoidianos na placenta
447 tem sido associada a complicações na gravidez, como pré-eclâmpsia, aborto, DMG e RCIU
448 (ADU-GYAMFI; WANG; DING, 2020; BIONDI; KAHALY; ROBERTSON, 2019;
449 KURLAK et al., 2013; PINTO et al., 2023; WANG et al., 2021b).

450 O hipotireoidismo materno é um importante distúrbio cardiometabólico que

451 compromete a gestação e o ambiente intrauterino e é caracterizado principalmente pela redução
452 da concentração plasmática de T4 livre, e aumento de TSH circulante. Redução nas
453 concentrações maternas de T4 livre resultam não somente em efeitos adversos à saúde materna
454 e fetal (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; SULLIVAN, 2019), como também na prole
455 ao longo do crescimento e na vida adulta (ESHKOLI et al., 2019; GE et al., 2020; MIAO et al.,
456 2021). Gestantes com hipofunção tireoidiana apresentam abortos recorrentes e complicações
457 durante o período pré-natal, como pré-eclâmpsia, descolamento de placenta, parto prematuro e
458 RCIU (SHRESTHA; TRIPATHI; DONGOL, 2019; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018;
459 WANG et al., 2021b). Além disso, favorece o desenvolvimento de disfunções metabólicas
460 (KEMKEM et al., 2020; TAPIA-MARTÍNEZ et al., 2019), cardiovasculares (GODOY et al.,
461 2014; MIAO et al., 2021), neurocognitivas (GE et al., 2020) e reprodutivas na prole adulta
462 (KOBAYASHI et al., 2014; PANAHANDEH et al., 2022).

463 Em modelo experimental com ratas, o hipotireoidismo materno resulta em redução do
464 peso fetal, redução da unidade útero-placenta, alteração da morfologia placentária e redução da
465 migração trofoblástica uterina (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014),
466 bem como comprometimento do metabolismo materno, placentário, fetal e pós-natal da prole
467 (KEMKEM et al., 2020; KENT et al., 2023; KENT; ATLURI; CUFFE, 2022; SILVA;
468 OCARINO; SERAKIDES, 2015). Semelhante a outras doenças gestacionais associadas à RCIU
469 e redução da migração trofoblástica, como a pré-eclâmpsia (BURTON et al., 2019), estudos
470 tem demonstrado os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nas alterações causadas
471 pelo hipotireoidismo materno como o comprometimento do estabelecimento do ambiente anti-
472 inflamatório na interface materno-fetal, além do aumento da apoptose (SILVA et al., 2012;
473 SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014). Além disso, há alteração da vascularização
474 placentária e decidual, da população de células dNKs DBA+, e desregulação da expressão de
475 genes chave associados à atividade angiogênica e hormonal placentária (SILVA; OCARINO;
476 SERAKIDES, 2015; SOUZA et al., 2017, 2020).

477 DOS ANJOS CORDEIRO et al. (2022) também demonstraram ocorrência de estresse
478 oxidativo e reticular na placenta e decídua de ratas hipotireoideas, que possivelmente é
479 decorrente da redução da migração trofoblástica intrauterina e das alterações na angiogênese
480 decidual (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014, 2015, 2017), semelhante ao observado na
481 placenta de mulheres com pré-eclâmpsia e RCIU (BURTON et al., 2019). Associado ao estresse
482 oxidativo e reticular, o hipotireoidismo materno também compromete a função mitocondrial
483 (KENT et al., 2023), alterações que podem aumentar a produção e a secreção de citocinas pró-
484 inflamatórias pela ativação de vias clássicas da inflamação, como a do fator nuclear- κ B (Nf-

485 κ B) (AOUACHE et al., 2018; CINDROVA-DAVIES et al., 2007), como também de outras vias
486 de inflamação estéril, como a via do inflamassoma NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain*
487 *Containing 3*) (LI et al., 2020). Esse mecanismo de inflamação associado a alta resposta
488 inflamatória denominada “tempestade de citocinas” foi observado na infecção por SARS-COV-
489 2 (YANG et al., 2021) e obesidade (VANDANMAGSAR et al., 2011) e recentes estudos
490 demonstraram que há aumento da expressão de fatores da via de inflamassoma-NLRP3-
491 piroptose na interface materno-fetal de ratas hipotireoideas (DOS ANJOS CORDEIRO et al.,
492 2024; SANTOS et al., 2023a). Esses estudos têm permitido não somente compreender os
493 mecanismos associados à disfunção gestacional causada pelo hipotireoidismo materno, como
494 também tem possibilitado rastrear possíveis alvos terapêuticos.

495

496 **4.4. Efeitos da kisspeptina em doenças gestacionais e na programação intrauterina**

497 Em estudos recentes em ratas, a administração materna de Kp10 demonstrou ser uma
498 potencial ferramenta terapêutica contra os efeitos adversos gestacionais causados pelo
499 hipotireoidismo materno, uma vez que melhorou o desenvolvimento placentário e a RCIU, além
500 de diminuir o dano oxidativo, suprimir a ativação da via NLRP3-inflamassoma-piroptose e
501 modular positivamente fatores de crescimento e imunológicos (SANTOS et al., 2022c, 2023a).
502 Além disso, o tratamento materno com Kp10 melhorou as concentrações plasmáticas de T4
503 livre em ratas gestantes hipotireoideas (SANTOS et al., 2022c), sugerindo a kisspeptina como
504 uma ferramenta terapêutica para mulheres gestantes hipotireoideas refratárias ao uso de
505 levotiroxina (CENTANNI; BENVENGA; SACHMECHI, 2017).

506 Estudos de aborto espontâneo recorrente em camundongos, outra complicação
507 gestacional associada ao hipotireoidismo materno e outras endocrinopatias (KAUR; GUPTA,
508 2016; SHRESTHA; TRIPATHI; DONGOL, 2019), também demonstraram que o tratamento
509 materno com Kp10 preveniu a perda gestacional, promovendo um melhor balanço entre
510 citocinas pró e anti-inflamatórias e a formação de um microambiente imunológico mais
511 adequado na interface materno-fetal (YANG et al., 2024)

512 O estresse celular e a disfunção glicêmica desempenham também papéis cruciais na
513 programação metabólica (AIKEN; OZANNE, 2014; HUFNAGEL et al., 2022), fazendo com
514 que pesquisadores busquem por ferramentas que consigam atenuar esses efeitos, resultando em
515 melhora do metabolismo materno, placentário, fetal e de gerações futuras (AIKEN; OZANNE,
516 2014; HUFNAGEL et al., 2022; KRAMER et al., 2023). Os efeitos da Kp10 em ratas gestantes
517 hipotireoideas sugerem que esse peptídeo melhora o ambiente intrauterino e a função

518 placentária (SANTOS et al., 2022c, 2023a), sendo que estudos já demonstraram o papel
519 regulatório da kisspeptina na homeostase glicêmica gestacional (BOWE et al., 2019). No
520 entanto, ainda não há informações sobre a ação da kisspeptina no controle glicêmico em
521 doenças gestacionais metabólicas.

522 Visto então que a kisspeptina regula fatores importantes da programação metabólica
523 fetal (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; GLUCKMAN et al., 2008) e da função
524 placentária em modelo de hipotireoidismo materno (SANTOS et al., 2022c, 2023a), e que o
525 hipotireoidismo materno causa alterações placentárias e sistêmicas similares a outras doenças
526 gestacionais como pré-eclâmpsia e DMG (GONG; LIU; LIU, 2016; SHRESTHA; TRIPATHI;
527 DONGOL, 2019; WANG et al., 2021b), sugere-se que a kisspeptina tenha a capacidade de
528 melhorar o metabolismo materno e placentário e a programação metabólica fetal em doenças
529 gestacionais cardiometabólicas.

530

531

532

533 5. **CAPÍTULO 1**

534

535

536

537

538

539

540

541 **KISSPEPTINA ATENUA A DESREGULAÇÃO PLACENTÁRIA DE MTOR E**

542 **MEDIADORES DA HOMEOSTASE GLICÊMICA CAUSADA PELO**

543 **HIPOTIREOIDISMO MATERNO EM RATAS**

544

545 **KISSEPTINA ATENUA A DESREGULAÇÃO PLACENTÁRIA DE mTOR E**
546 **MEDIADORES DA HOMEOSTASE GLICÊMICA CAUSADA PELO**
547 **HIPOTIREOIDISMO MATERNO EM RATAS**

548

549

RESUMO

550

551 Redução da sinalização placentária de mTOR está associada a restrição de crescimento
552 intrauterino (RCIU) e falhas no metabolismo materno e placentário. Uma vez que o
553 hipotireoidismo materno (HM) causa RCIU e o tratamento materno com kisspeptina-10 (Kp10)
554 melhora o desenvolvimento feto-placentário em ratas hipotireoideas, o objetivo deste estudo foi
555 avaliar o efeito da Kp10 na homeostase energética materna e expressão placentária de mTOR e
556 de mediadores do metabolismo glicêmico em ratas hipotireoideas. O HM foi induzido com
557 propiltiouracil e o tratamento com Kp10 começou no 8º dia de gestação. O HM causou
558 intolerância a glicose, redução de insulina e de HDL, além da redução do peso fetal e placentário
559 e das camadas da placenta e da barreira interhemal. O HM desregulou a expressão de Glut1,
560 aumentou INSR β e AKT, e reduziu a expressão de p-mTOR/*mTor*. O tratamento com Kp10,
561 apesar de não melhorar a homeostase glicêmica materna e a redução do crescimento feto-
562 placentário, atenuou a desregulação placentária de Glut1 causada pelo HM, além de regular
563 positivamente o eixo IGF1/IGF1r e restaurar a expressão placentária de AKT/mTOR. Conclui-
564 se que o tratamento com Kp10 em ratas com hipotireoidismo materno melhora a sinalização
565 placentária de mTOR e a expressão de mediadores do metabolismo glicêmico, sugerindo novas
566 vias pelas quais a kisspeptina modula a fisiologia placentária.

567

568

569

570 **Palavras-chaves:** Feto; Glicose; Kiss1; mTOR; Metabolismo.

571

572

5.1. INTRODUÇÃO

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

A função endócrina placentária é essencial para o sucesso gestacional, uma vez que a placenta sintetiza diversos hormônios e fatores que regulam o metabolismo materno, o desenvolvimento fetal, inclusive a lactação e a aptidão materna pós-natal (COSTA, 2016; NAPSO et al., 2018). Neste sentido, a regulação da homeostase glicêmica materna é um dos principais ajustes metabólicos durante a gestação. Resistência à insulina periférica e aumento da glicemia basal ocorre na mãe gestante para facilitar o transporte transplacentário de glicose e permitir o crescimento e desenvolvimento adequado do feto (FOWDEN et al., 2008; NEWBERN; FREEMARK, 2011). Para isso, hormônios e fatores de crescimento placentários como lactogênios placentários (PL- I e II), IGF-1, leptina e prolactina são cruciais, tanto na regulação da homeostase energética, como para o estabelecimento adequado do eixo placenta-pâncreas (COSTA, 2016; FOWDEN et al., 2008; HILL, 2018; NEWBERN; FREEMARK, 2011; SZLAPINSKI; HILL, 2020). Desta forma, a desregulação desses hormônios está associada a diversas doenças gestacionais, como diabetes *mellitus* gestacional (DMG), pré-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino (RCIU) (BOWMAN; ARANY; WOLFGANG, 2021; COSTA, 2016; NAPSO et al., 2018).

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

Embora o mecanismo de resistência à insulina durante a gestação não seja completamente compreendido, é sugerido que a via de sinalização IRS/PI3K/mTOR também esteja envolvida no processo (AKHAPHONG et al., 2021; VILLALOBOS-LABRA et al., 2017). O mTOR complexo 1 (mTORC1), um importante sensor energético placentário (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016), tem sido sugerido como um fator intermediador entre a função placentária e a programação de disfunção metabólica e resistência à insulina na prole adulta (AKHAPHONG et al., 2021). Além disso, falhas na sinalização IRS/PI3K/AKT/mTOR estão associadas a alterações morfofisiológicas na placenta relacionadas à RCIU, obesidade, diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (AKHAPHONG et al., 2021; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; TSAI et al., 2021), sugerindo o mTOR como um alvo terapêutico potencial para doenças gestacionais.

601

602

603

604

605

606

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a administração materna de kisspeptina-10 em um modelo de hipotireoidismo gestacional melhorou o ambiente intrauterino e o desenvolvimento fetal (SANTOS et al., 2022c, 2023a). Apesar da kisspeptina ser conhecida principalmente por sua atividade reguladora do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al., 2003), atualmente é considerada um importante peptídeo para o sucesso gestacional (HU et al., 2019; SZYDELKO-GORZKOWICZ et al.,

2022; TSOUTSOUKI et al., 2022). Além disso, estudos demonstraram o papel da kisspeptina na homeostase glicêmica por modular a liberação de insulina e estimular a adaptação de células β pancreáticas durante a gestação (BOWE et al., 2009, 2012, 2019; IZZI-ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019). Considerando que oscilações nos níveis plasmáticos e placentários de kisspeptina estão associadas à DMG (ĆETKOVIĆ et al., 2012; KAPUSTIN et al., 2020), é possível sugerir que alterações na sinalização placentária de kisspeptina podem resultar em comprometimento da homeostase glicêmica materna e ser um fator para o desenvolvimento de DMG (BOWE et al., 2019; IZZI-ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019; SZLAPINSKI; HILL, 2020). Dessa forma, uma hipótese deste trabalho é que kisspeptina estimula a ativação da via de sinalização IRS/PI3K/AKT/mTOR na placenta, pois não há estudos que tenham avaliado o papel da kisspeptina na expressão de mTOR placentário.

O hipotireoidismo materno (HM) é outra importante doença metabólica gestacional, que semelhante à DMG está associada à disfunção placentária e RCIU (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; SULLIVAN, 2019), bem como comprometimento da homeostase glicêmica materna e alterações dos hormônios placentários, inclusive do PL-II (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022; SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2015). Além disso, estudos prévios demonstraram baixa expressão placentária do sistema kisspeptina na placenta de ratas hipotireoideas (SANTOS et al., 2022b). No entanto, faltam estudos avaliando a sinalização placentária de mTOR no hipotireoidismo materno. Desta forma, procuramos avaliar, em um modelo de hipotireoidismo materno, a expressão placentária de mediadores da homeostase glicêmica, com destaque para a via de sinalização de mTOR, e o papel modulatório da administração materna de kisspeptina-10 sobre essa via.

629

630 **5.2. MATERIAL E MÉTODOS**

631 *Animais*

632 Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e
633 Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais
634 foram mantidos em caixas plásticas (5-6 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2 °C) e
635 luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas, com água e ração comercial *ad*
636 *libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no
637 Uso de Animais da UESC (CEUA N° 026/22).

638

639 *Delineamento experimental*

640 As ratas (210 ± 10 g) foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n = 28) e
641 hipotireoideo (n = 42). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária, por sonda
642 orogástrica, de 6-propyl-2-thiouracil (PTU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em
643 água destilada (4 mg/Kg/dia) iniciando cinco dias antes do acasalamento, enquanto os animais
644 controles receberam somente água destilada. Ratas em proestro foram alocadas com machos
645 *overnight*, e a presença de espermatozoides em citologia vaginal na manhã seguinte confirmou
646 a cópula e foi determinada como 0 dia gestacional (DG). Após confirmação da cópula, os
647 animais hipotireoideos foram divididos nos grupos hipotireoideo (n = 21) e hipotireoideo
648 tratado com kisspeptina-10 (Kp10; n = 21). O tratamento com Kp10 (8 µg/Kg/dia/IP; Tocris
649 Bioscience, Bristol, UK) iniciou no 8º DG, enquanto os outros animais receberam água estéril
650 como veículo (SANTOS et al., 2022c). No 16º DG, as ratas foram submetidas aos testes de
651 tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e teste de tolerância intraperitoneal a insulina
652 (TTIPI). Parte dos animais foram eutanasiados aos 14 e 18 DG (6-9 animais por grupo), e o
653 restante (6-11 animais por grupo) foi aguardado o parto e feito acompanhamento do peso
654 neonatal (3 dias pós-nascimento) e quando jovens (21 dias pós-nascimento).

655

656 *Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a insulina*
657 *(TTIPI).*

658 No TTIPG, após jejum por 6 horas, a glicemia basal dos animais foi avaliada entre
659 11:00-12:00 seguida da administração de glicose (2g/Kg/animal), via intraperitoneal, e
660 posterior avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. Em seguida, os animais foram alimentados
661 *ad libitum* por 1 hora e mantidos em jejum por 1 hora para o TTIPI. A glicemia basal foi
662 novamente avaliada e, logo após, aplicada insulina (0,75 UI/Kg/animal), via intraperitoneal,
663 com posterior avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. A glicemia foi dosada com uma gota
664 de sangue da ponta da cauda utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Performa, Roche,
665 USA). O TTIPI foi realizado no mesmo dia e com jejum de 1 hora para evitar maior estresse ao
666 animal e por não apresentar diferenças na glicemia basal e na curva glicêmica em relação ao
667 teste realizado em dia diferente (intervalo de 1 semana) e com jejum de 6 horas (DA SILVA et
668 al., 2025; submetido)

669 A área sob a curva (AUC) do TTIPG e do TTIPI foram calculados seguindo a seguinte
670 equação (ALTMAN, 1990):

671

672
$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (tempo_{i+1} - tempo_i)(glicemia_i + glicemia_{i+1})$$

673

674 *Necropsia e coleta de material*

675 As eutanásias foram realizadas no período da manhã (9:00-12:00). Primeiramente, os
676 animais foram pesados antes da eutanásia para quantificação do ganho de massa corporal
677 durante a gestação. A glicemia foi medida com uma gota de sangue da ponta da cauda. As mães
678 aos 14 e 18 DG, bem como os fetos, foram eutanasiados por decapitação, com coleta de sangue
679 da artéria cervical em tubos heparinizados. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20
680 minutos, e o plasma sobrenadante armazenado a -20°C .

681 Durante a necropsia foram coletados e pesados o útero gravídico e o pâncreas materno.
682 Posteriormente, o útero foi dissecado para coleta e pesagem da placenta e dos fetos, além de
683 contabilização do número de fetos e o número de sítios com reabsorção ou morte fetal. Para
684 evitar o efeito de diferentes tamanhos de ninhada sobre a massa corporal final materna, o ganho
685 de massa corporal materna foi obtido pela subtração da massa final histerectômica pela massa
686 corporal inicial, e a massa do pâncreas também foi calculada relativo à massa corporal
687 histerectômica da mãe.

688 Fragmentos de dois discos placentários (sem decídua) de fetos viáveis de cada animal
689 foram escolhidos aleatoriamente, armazenados em Trizol separadamente, seguido de
690 congelamento em nitrogênio líquido e estocagem a -80°C para análises de reação em cadeia da
691 polimerase de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR). Dois sítios completos (placenta +
692 decídua basal + triângulo metrial) por animal também foram escolhidos aleatoriamente e junto
693 com o pâncreas materno foram fixados em paraformaldeído 4% à 4°C por 24 horas e
694 processados pela técnica de inclusão em parafina para análises histológicas e imuno-
695 histoquímicas. Os tecidos foram desidratados em solução seriada de álcool 70% até 100%, com
696 posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Cortes de $4\mu\text{m}$ dos
697 tecidos foram obtidos por microtomia em lâminas histológicas para avaliação
698 histomorfométrica. Para imuno-histoquímica foram utilizadas lâminas polarizadas silanizadas
699 (StarFrost Polycat, Germany).

700

701 *Análise hormonal*

702 Foram feitas as dosagens de T4 livre (IMMULITE, Siemens Medical Solutions
703 Diagnostics, Malvern, PA, USA) e insulina plasmática (EZRMI-13K Insulin ELISA; EMD

704 Millipore Corporation, Missouri, USA) por meio de ELISA (sensibilidade: 0,4 ng/dL e 0,1
705 ng/mL, respectivamente) com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante.

706

707 *Análise Bioquímica*

708 Foram feitas as dosagens plasmáticas de triglicerídeos (K117; Quibasa Química Básica
709 Ltda.; Minas Gerais, BR), Colesterol total (100/280-500; VIDA Biotecnologia LTDA.; Minas
710 Gerais, BR) e lipoproteína de alta densidade (*High-Density Lipoprotein* – HDL) (K071;
711 Quibasa Química Básica Ltda.; Minas Gerais, BR) com kits comerciais e de acordo as
712 instruções de uso do fabricante, utilizando o analisador bioquímico semiautomático BIO-2000.
713 A lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein* – LDL) foi calculada conforme a
714 fórmula de Friedewald:

$$715 \quad LDL = \text{Colesterol total} - \left(HDL \text{ (mg/dL)} + \frac{\text{Triglicerídeos (mg/dL)}}{5} \right)$$

716

717 *Avaliação histomorfométrica da placenta*

718 A análise histomorfométrica da placenta foi realizada em cortes histológicos corados
719 com Hematoxilina e Eosina, e cortes corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS)
720 contracorados com *fastgreen*. Foram realizadas a quantificação das áreas das camadas da
721 placenta (zona juncional e labirinto placentário) pelo software NDP.view2 (Hamamatsu
722 Photonics K.K., Hamamatsu, Shizuoka, JPN).

723 Na zona juncional, foi quantificado o acúmulo de glicogênio representando as células
724 de glicogênio através da coloração de PAS e do software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics
725 Manufacturing, Rockville, MD, USA).

726 Na zona de labirinto as avaliações foram feitas através da dupla-marcação com
727 citoqueratina e vimentina para identificação dos trofoblastos e capilares fetais, respectivamente,
728 através do protocolo adaptado de DE CLERCQ et al., 2020. As lâminas foram desparafinizadas,
729 hidratadas, e feito o bloqueio de peroxidase endógena por incubação em peróxido de hidrogênio
730 3% por 10 minutos. Realizou a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6) em banho
731 maria a 80°C por 30 minutos e 10 minutos em temperatura ambiente, seguido do bloqueio com
732 soro de cabra 10% + *Katrien's buffer* 90% por 15 minutos e incubação com o anticorpo anti-
733 vimentina (Abcam, ab92547, 1:200) *overnight* a 4° C. No dia seguinte, as lâminas ficaram 1
734 hora e 30 minutos a temperatura ambiente, foram incubadas por 1 hora com o anticorpo
735 secundário de cabra (Abcam, ab6720; 1:1000), e em seguida com a estreptavidina (Strep-HRP

736 Rockland, S000-03, 1:500) por mais 1 hora. O cromógeno utilizado para vimentina foi a 3'3
737 diaminobenzidina (Abcam, ab64238) por 10 minutos. Em seguida, realizou-se uma segunda
738 recuperação antigênica com pepsina diluída em HCL (Sigma, 0.04% em 0.01 M HCl) a 37°C
739 por 10 minutos, seguido do bloqueio em soro de cabra 10% + *Katrien's buffer* 90% por 15
740 minutos e incubação com anticorpo anti-pancitoqueratina (Novusbio, NB600-579, 1:75)
741 *overnight* a 4° C. No dia seguinte, as lâminas ficaram 2 horas a temperatura ambiente, foram
742 incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugada com fosfatase alcalina
743 (Abcam, ab6722, 1:500) por 1 hora, seguido da revelação com NBT/BCIP (ThermoFisher,
744 34042) por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram contra coradas com *fast red* (Vector, H-3403)
745 por 4 minutos. Entre as etapas, as lâminas foram lavadas com solução tris-salina tamponada
746 com Twee-20 (TBS-T) (DE CLERCQ et al., 2020; VERAS; COSTA; MAYHEW, 2014).

747 Foi determinada o volume dos compartimentos do labirinto (capilar fetal, seio vascular
748 materno e trofoblastos), área de superfície (capilar fetal e seio vascular), medidas do capilar
749 fetal (comprimento total, área e o diâmetro), e espessura da barreira interhemal, além do cálculo
750 da capacidade de difusão teórica e específica (COAN; FERGUSON-SMITH; BURTON, 2004;
751 VERAS; COSTA; MAYHEW, 2014).

752

753 *Imuno-histoquímica*

754 Foram utilizados os anticorpos anti-receptor de insulina β (INSR β ; 1:50; sc-711, Santa
755 Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-IGF1R (, 1:50; sc-713, Santa Cruz Biotechnology, CA,
756 USA), anti-AKT (1:200; 9272S , Cell Signaling Technology Inc, MA , USA), anti-p-mTOR
757 (1:200; sc-293133, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GLUT1 (1:100; sc-377228,
758 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), e anti-INS (1:500; sc-8033; Santa Cruz Biotechnology,
759 CA, USA).

760 A técnica utilizada foi a de estreptavidina-biotina-peroxidase pelo sistema de detecção
761 Dako (EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link)). A recuperação antigênica foi realizada
762 pelo calor em banho maria a 98°C utilizando solução de ácido cítrico com pH 6,0. Os cortes
763 foram imergidos em solução de peróxido de hidrogênio (3 %; H₂O₂) com metanol (CH₃OH)
764 por 30 min para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, as lâminas foram incubadas por
765 mais 30 minutos em solução de soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp.,
766 Fremont, CA. USA) e incubadas *overnight* com o anticorpo primário. Após lavagem em solução
767 de fosfato tamponada (PBS, pH 7,2), foi adicionado aos cortes solução de estabilização de
768 proteínas (EnVision™ FLEX +, Mouse (LINKER); ref. SM804), seguido de anticorpo
769 secundário conjugado com estreptavidina peroxidase (EnVision™ FLEX/HRP; ref. SM802)

770 por 30 min. O cromógeno utilizado foi a 3'3 diaminobenzidina (EnVision™ FLEX DAB+
771 Chromogen; ref. DM827), diluído em tampão com H₂O₂ (EnVision™ FLEX Substrate Buffer;
772 1:50; ref. SM803). As secções foram contracoradas com hematoxilina e o controle negativo foi
773 obtido pela substituição do anticorpo primário por solução de fosfato tamponada (PBS) (ILIE
774 et al., 2017; SANTOS et al., 2023a).

775 Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da expressão imuno-histoquímica
776 de INSR β , IGF1R, p-mTOR e GLUT1 nas camadas de zona juncional e labirinto placentário.
777 Para determinar a área de imunomarcção em cada região da placenta, as imagens foram
778 fotografadas com um Microscópio fotônico *Leica DM2500*. A área de imunomarcção foi
779 determinada por meio do software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing,
780 Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram feitas e os dados
781 de cada disco placentário foram arquivados, analisados e expressos como área de
782 imunomarcção em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SANTOS et al., 2023).
783 Para avaliação do pâncreas endócrino materno, foi quantificado o número de ilhotas
784 pancreáticas marcadas com INS por secção, utilizando três secções intervalas em 12 μ m entre
785 elas.

786

787 *qRT-PCR*

788 Para a técnica de qRT-PCR, foi realizada a extração do RNA total da placenta pelo uso
789 do Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do
790 fabricante. A análise da concentração e da qualidade do RNA de cada tecido foi realizada com
791 Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific).

792 Para as reações de transcrição reversa, utilizou-se 1 μ g de RNA e o kit comercial
793 GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo
794 foram quantificados pela qPCR utilizando o equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-
795 Time PCR System. Para as reações de PCR, utilizou-se 1,5 μ L de cDNA, 100 nM de cada
796 iniciador e 12,5 μ L do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 μ L
797 de reação. Como controle negativo utilizou o mix de amplificação de DNA, em que a amostra
798 de cDNA foi substituída por água. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições:
799 ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e
800 anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. A linearidade e a eficiência da amplificação da qPCR
801 foram avaliadas através de curvas padrões dos transcritos geradas utilizando diluições seriadas
802 do cDNA. Os iniciadores para *Insr*, *Isr-1*, *Igf1r*, *Igf1*, *mTor*, *Raptor*, *Glut1*, *rPrl*, *PlII* e *Lep*

803 foram selecionados de estudos anteriores ou do *National Center for Biotechnology Information*
 804 (NCBI) com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica
 805 foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram
 806 comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de *Polr2a Rattus*
 807 *norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014; SOLANO et al., 2016).

808

809 Tabela 1 - Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores	Referência
<i>Insr</i>	F: GGCCCGATGCTGAGAACA R: CGTCATTCCAAAGTCTCCGA	(HAGHIR et al., 2013)
<i>Irs-1</i>	F: GGCACCATCTCAACAATC R: GTTCCACCCACCATAC	(ABDELMAGEED et al., 2021)
<i>Igf1r</i>	F: CTGCTCAAAGACAAAATACCCATC R: ACCGCACACTTCTGTCTTGG	NCBI
<i>Igf1</i>	F: ACCCGGGACGTACCAAAATG R: CGAGCTGGTAAAGGTGAGCA	(SANTOS et al., 2022c)
<i>mTor</i>	F: GATACGCCGTCATTCCCTC R: TGCTCAAACACCTCCACC	(YIN et al., 2020)
<i>Raptor</i>	F: CCCTTTACACCATGCATAGCT R: GAGGGTTACCATTGTGGAAGT	(MAZUMDER; PATIAL; SINGH, 2019)
<i>Glut1(Slc2a1)</i>	F: CAATCAAACATGGAACCACCG R: CGATTGATGAGCAGGAAGCG	(GUO et al., 2020)
<i>rPrl</i>	F: GCCTCTCAAGCTAAAGGACAC R: TTTTCTTCAGGTTGGCCCCTT	NCBI
<i>PIII</i>	F: TTACCGAATGTCCACTGG R: TGCAAATCTGACCACTCAG	(LEE et al., 2003)
<i>Lep</i>	F: GTTCCTGTGGCTTTGGTCCT R: CTGGTGACAATGGTCTTGATGA	(LECOUTRE et al., 2017)
<i>Polr2a</i>	F: GCTGGACCTACTGGCATGTT R: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	(SANTOS et al., 2022b)

810 NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

811

812 *Análise estatística*

813 Primeiro, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov
814 e D'Agostino-Pearson omnibus) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) dos erros (GraphPad
815 Prism 10.1.2). Os valores médios dos grupos para massa placentária, fetal, eficiência placentária
816 e glicemia fetal foram determinados através da análise de um modelo linear misto seguido do
817 teste de Bonferroni. Nesse modelo, a mãe foi incluída como sujeito e fator aleatório, sendo o
818 tratamento considerado como fator fixo e o tamanho da ninhada como variável de covariância
819 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp) (LOPEZ-TELLO
820 et al., 2023). Os demais dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido de
821 teste Student-Newman-Keuls (SNK) e teste t de Student. Os dados estão representados por
822 Média \pm Erro padrão da média (SEM) e as diferenças foram consideradas estatisticamente
823 significativas quando $P < 0,05$.

824

825 **5.3. RESULTADOS**

826 *O tratamento materno com Kp10 não influenciou a disfunção glicêmica e redução da insulina*
827 *plasmática e HDL causadas pelo hipotireoidismo em ratas gestantes.*

828 Uma vez que estudos demonstraram que o HM compromete a glicemia materna (KENT
829 et al., 2023), primeiramente foi avaliado o efeito do tratamento com Kp10 sobre a homeostase
830 glicêmica das ratas. A indução do hipotireoidismo foi confirmada pela redução dos valores
831 plasmáticos de T4 livre no grupo hipotireoideo em comparação ao controle ($P < 0,0001$). O
832 tratamento com Kp10 não alterou os valores plasmáticos de T4 livre, mantendo-os similares ao
833 do grupo hipotireoideo ($P > 0,05$; Figura 1A).

834 Ao avaliar a glicemia em jejum aos 16 DG, foi observado que o HM aumentou a
835 glicemia basal comparado ao controle ($P < 0,05$), e que o tratamento com Kp10 não influenciou
836 essa glicemia dos animais ($P > 0,05$; Figura 1B). Por outro lado, não foram observadas
837 diferenças significativas nas dosagens aleatórias de glicemia aos 18 DG ($P > 0,05$; Figura 1C).
838 Contudo, o HM reduziu a concentração plasmática de insulina aleatória aos 18DG ($P < 0,01$;
839 Figura 1D), e o tratamento materno com Kp10 não influenciou a redução da insulina causada
840 pelo hipotireoidismo ($P > 0,05$; Figura 1D).

841 No TTIPG aos 16 DG, foi observado que o HM aumentou a glicemia materna nos
842 tempos 0, 30 e 60 minutos ($P < 0,05$; $P < 0,01$; Figura 1E), indicando intolerância à glicose,
843 como também foi demonstrado na análise da AUC ($P < 0,01$; Figura 1F). O tratamento com
844 Kp10 não afetou a intolerância à glicose apresentada pelas ratas hipotireoideas aos 0, 30 e 60

845 minutos ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$; Figura 1E-F). Em relação ao TTIPI, não foram
846 encontradas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 1G-H).

847 Para complementar a análise glicêmica e insulínica, quantificamos a massa pancreática
848 das ratas e o número de ilhotas pancreáticas por área. Não foram observadas diferenças
849 significativas na massa relativa do pâncreas e nem no número de ilhotas de Langerhans ($P >$
850 $0,05$; Figura 1I-J)

851 Considerando a intolerância à glicose apresentada pelas ratas, também realizamos nos
852 animais a dosagem de triglicerídeos, colesterol total e suas frações para avaliar o metabolismo
853 lipídico, devido a íntima relação do metabolismo glicêmico e lipídico na homeostase energética
854 (YANG; VIJAYAKUMAR; KAHN, 2018). Apesar de não serem observadas diferenças
855 significativas nas concentrações plasmáticas de triglicerídeo, colesterol total e LDL entre os
856 grupos ($P > 0,05$; Figura 1 I, J e L), o HM reduziu a contração plasmática de HDL comparado
857 ao controle ($P < 0,05$), enquanto o tratamento com Kp10 não reverteu essa alteração ($P > 0,05$;
858 Figura 1K).

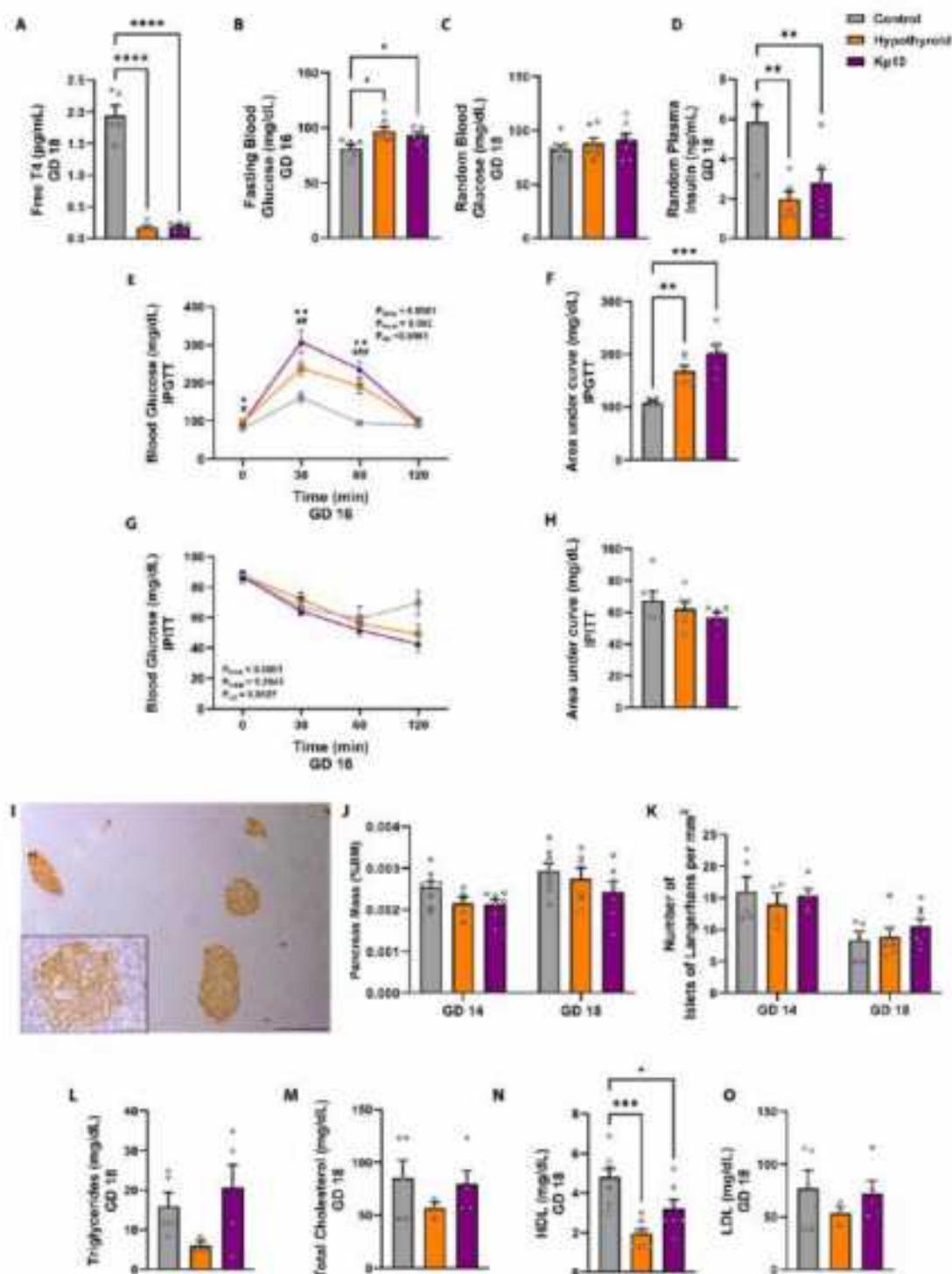


Figura 1 Perfil metabólico materno de ratos controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Dosagem plasmática de T4 livre aos 18 DG. B) Glicemia em jejum aos 16 DG. C) Glicemia aleatória aos 18 DG. D) Insulina plasmática aleatória aos 18 DG. E) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 16 DG. F) Área sob a curva do TTIPG. G) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 16 DG. H) Área sob a curva do TTIPI. I) Fotomicrografia do pâncreas com imunomarcagem de insulina (Streptavidina-biotina-peroxidase, Hematoxilina de harris, Barra = 20 µm e 50 µm; J) Massa do pâncreas relativa à massa corporal materna aos 14 e 18 DG. K) Número de ilhotas de Langerhans por mm² aos 14 e 18 DG. L) Triglicérides aos 18 DG. M) Colesterol Total aos 18 DG. N) HDL aos 18 DG. O) LDL aos 18 DG (Anova de uma ou duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, exceto do E que * $P < 0,05$ controle vs. Hipotireoideo; ** $P < 0,01$ controle vs. Hipotireoideo; # $P < 0,05$ controle vs. Kp10; ## $P < 0,01$ controle vs. Kp10; ### $P < 0,001$ controle vs. Kp10. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; DG = dias de gestação. HDL = *High Density Lipoprotein*; LDL = *Low Density Lipoprotein*.

860 *O tratamento materno com Kp10 não alterou a restrição de crescimento fetal causada pelo*
861 *hipotireoidismo em ratas.*

862 Seguindo para a avaliação dos parâmetros materno-fetais aos 14 e 18 DG, foi observado
863 que o HM reduziu o ganho de massa corporal materna em ambas as idades gestacionais
864 comparado ao controle ($P < 0,0001$), e o tratamento com Kp10 não alterou essa redução ($P >$
865 $0,05$; Figura 2A). O HM reduziu o número de fetos viáveis aos 14 DG ($P < 0,01$); no entanto,
866 essa alteração não foi observada aos 18 DG ($P > 0,05$). A administração materna de Kp10 não
867 alterou a menor viabilidade fetal causada pelo HM ($P > 0,05$; Figura 2B). Ao mesmo tempo, o
868 HM reduziu a massa fetal aos 14 e 18 DG ($P < 0,01$; $P < 0,0001$), sendo que o tratamento com
869 Kp10 não foi capaz de reverter essa alteração ($P > 0,05$; Figura 2D). Não foram observadas
870 diferenças significativas na porcentagem de morte fetal em ambas as idades gestacionais ($P >$
871 $0,05$; Figura 2C).

872 O HM reduziu a massa placentária aos 14 DG comparado ao controle ($P < 0,05$),
873 enquanto o tratamento com Kp10 melhorou esse parâmetro, uma vez que não apresentou
874 diferença significativa em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). No entanto, aos 18 DG, a
875 administração de Kp10 reduziu a massa placentária quando comparado ao controle ($P < 0,05$),
876 enquanto o grupo hipotireoideo não apresentou diferença significativa com os demais grupos
877 ($P > 0,05$; Figura 2E). Não foram observadas diferenças significativas na eficiência placentária
878 em ambas as idades gestacionais ($P > 0,05$; Figura 2F), bem como nas dosagens plasmáticas
879 de glicose e insulina fetal aos 18 DG ($P > 0,05$; Figura 2G-H). Ao avaliar a massa corporal da
880 prole, o HM reduziu a massa corporal de machos e fêmeas no período neonatal, quando
881 comparado ao controle ($P < 0,001$), enquanto o tratamento com Kp10 apresentou tendência em
882 aumentar a massa corporal da prole fêmea em relação ao grupo hipotireoideo ($P = 0,0692$).
883 Não foram observadas diferenças significativas em ambos os sexos quando jovens ($P > 0,05$;
884 Figura 2I).

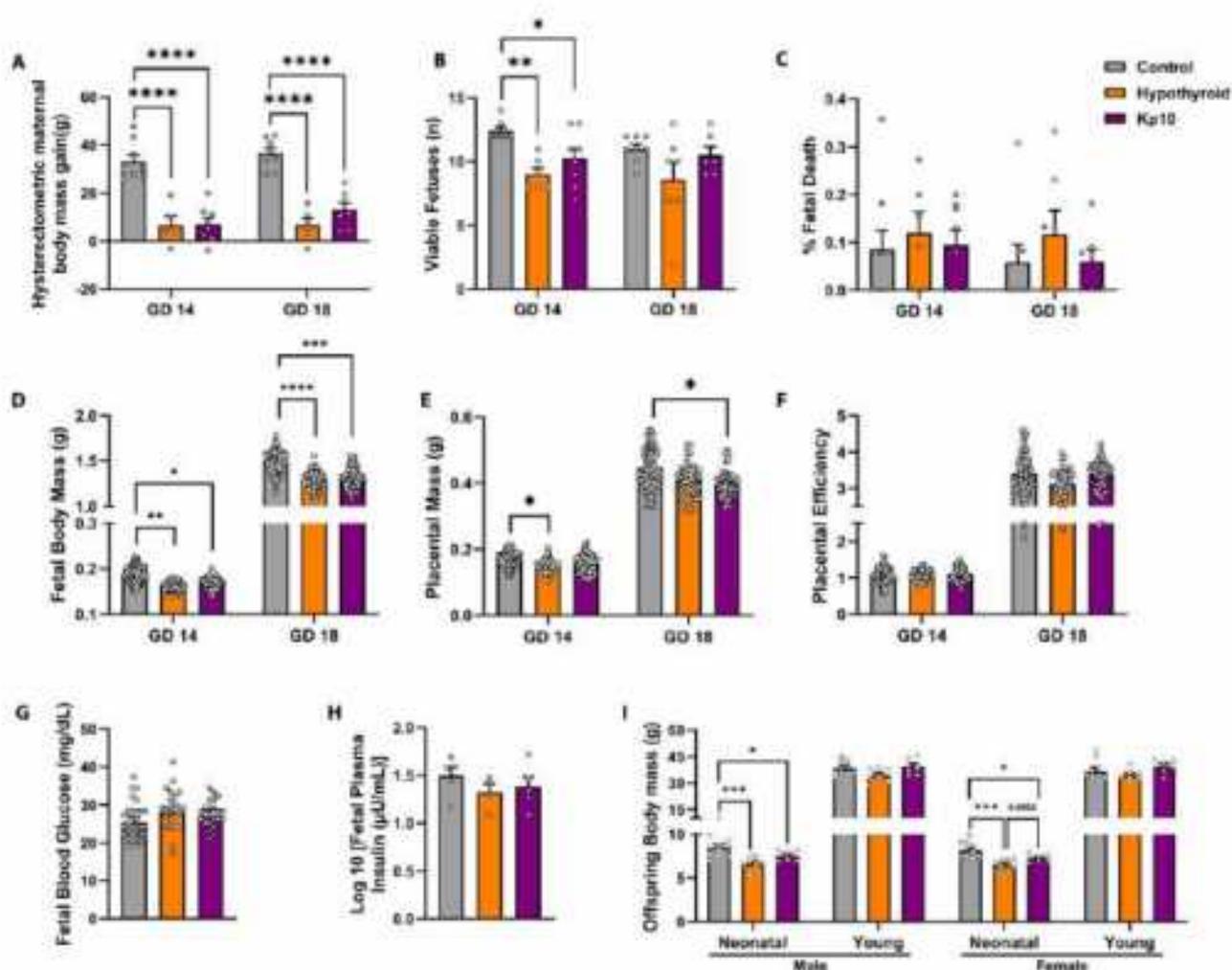


Figura 2 Dados maternos e da prole de ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Ganho de massa corporal histerectômica materno aos 18 DG. B) Número de fetos viáveis aos 14 e 18 DG. C) Taxa de morte fetal aos 14 e 18 DG. D) Massa corporal fetal aos 14 e 18 DG. E) Massa placentária aos 14 e 18 DG. F) Eficiência placentária aos 14 e 18 DG. G) Glicemia fetal aos 18 DG. H) Insulina plasmática fetal aos 18 DG. I) Massa corporal da prole neonatal e jovem. (A-C, H-I: Anova de uma via post hoc SNK; D-G: Modelo linear misto post hoc Bonferroni Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. Nos gráficos D-G foi feita a sobreposição de gráficos da média±SEM corrigidos pelo modelo linear misto, e a distribuição individual dos fetos, no Adobe Illustrator. DG = dias de gestação.

885

886 *O tratamento materno com Kp10 não reverte comprometimento da morfologia placentária*
 887 *causada pelo hipotireoidismo em ratas*

888 Visto que redução de peso fetal e placentário são acompanhados de modificações nas
 889 estruturas da placenta, foi feita a avaliação esteriológica da placenta (BURTON; FOWDEN;
 890 THORNBURG, 2016). Com isso, apesar de não serem observadas alterações no volume das
 891 camadas da placenta aos 14 DG ($P > 0,05$), aos 18 DG o HM reduziu o volume da decídua
 892 basal, zona juncional e zona de labirinto ($P < 0,05$) comparado ao controle, enquanto o
 893 tratamento com Kp10 não alterou o menor volume das zonas da placenta causado pelo

894 hipotireoidismo ($P > 0,05$; Figura 3 A-B).

895 Seguindo para zona juncional, foi avaliado o respectivo acúmulo de glicogênio por meio
896 da coloração de PAS (Figura 3C). O HM aumentou a área marcada por PAS aos 14 DG ($P <$
897 $0,01$), enquanto o grupo Kp10 restaurou as áreas marcadas por PAS, possuindo valor similar ao
898 grupo controle ($P > 0,05$). Aos 18 DG, não foram observadas diferenças significativas nas áreas
899 PAS-positivas ($P > 0,05$; Figura 3D). Na avaliação das estruturas da zona de labirinto por meio
900 da dupla marcação citoqueratina + vimentina (Figura 3E), não foram observadas diferenças
901 significativas entre os grupos no volume absoluto e área de superfície do capilar fetal, seio
902 vascular materno e trofoblasto, nem no comprimento, área e diâmetro do capilar fetal ($P > 0,05$;
903 Figura 3F-M). No entanto, redução significativa da espessura da membrana interhemal foi
904 observada no grupo hipotireoideo comparado ao controle ($P < 0,05$), e o tratamento com Kp10
905 não afetou essa redução ($P > 0,05$; Figura 3K). Não foram observadas diferenças significativas
906 na capacidade de difusão teórica e específica da membrana interhemal ($P > 0,05$; Figura 3L-
907 M).

908

909

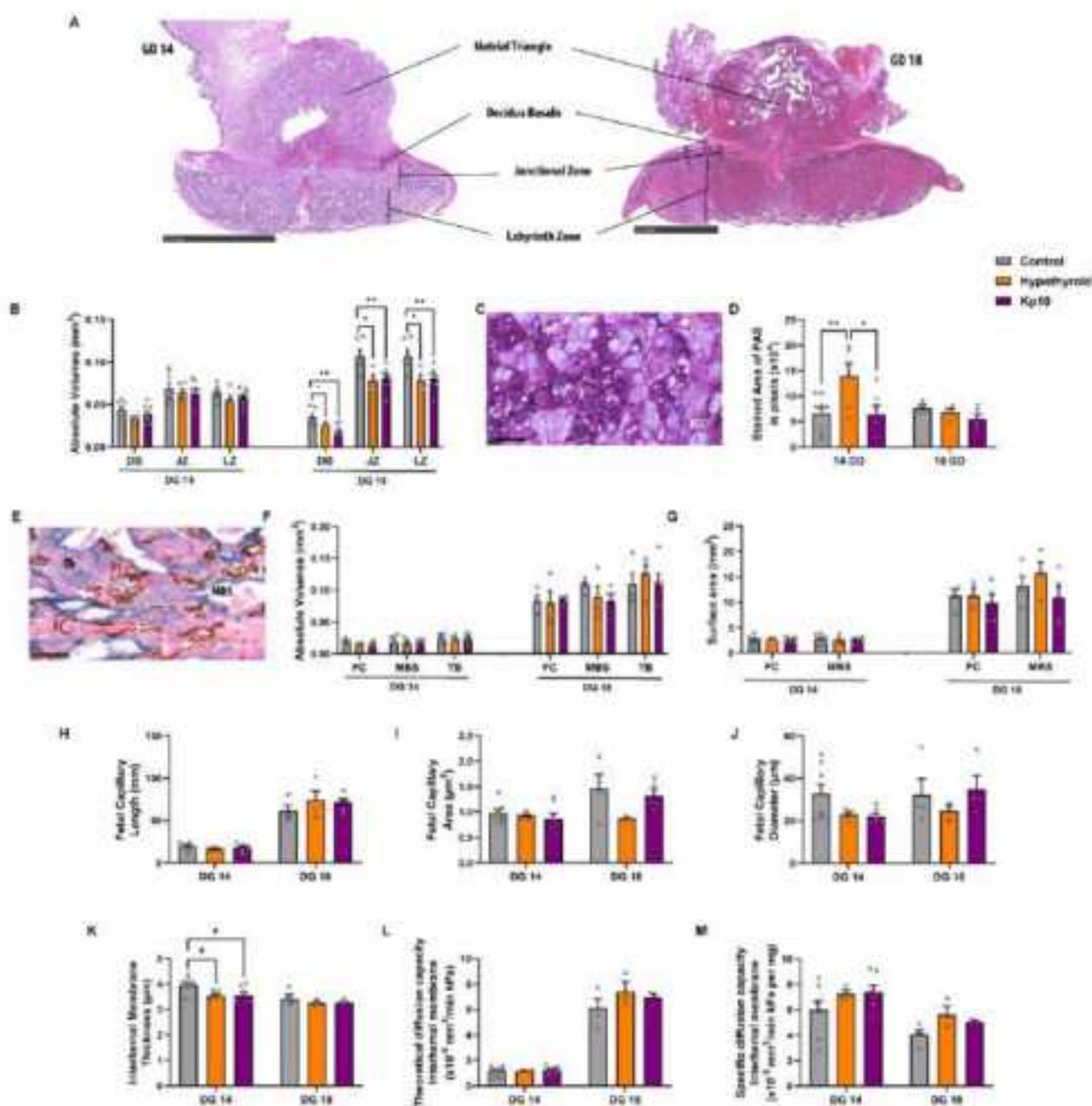


Figura 3 Avaliação da morfologia placentária de ratos controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Fotomicrografias de placentas aos 14 DG (Hematoxilina& Eosina; Aumento de x5; Barra = 2,5 mm). B) Volume absoluto das zonas da placenta aos 14 e 18 DG. C) Fotomicrografias da coloração de PAS na zona juncional (PAS; *Fast Green*; Aumento de 400x; Barra = 50µm). D) Área em pixels coradas por PAS aos 14 e 18 DG. E) Fotomicrografias da dupla marcação por citoqueratina + vimentina (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Fosfatase Alcalina-BCIP/NBT; *Fast Red*; Aumento de 800x; Barra = 20µm) F) Volume absoluto dos compartimentos da zona de labirinto aos 14 e 18 DG. G) Área de superfície da vasculatura da zona de labirinto aos 14 e 18 DG. H) Comprimento total do capilar fetal aos 14 e 18 DG. I) Área do capilar fetal aos 14 e 18 DG. J) Diâmetro do capilar fetal aos 14 e 18 DG. K) Espessura da Membrana Intravascular aos 14 e 18 DG. L) Capacidade de difusão teórica da membrana interhemal aos 14 e 18 DG. M) Capacidade de difusão específica da membrana interhemal aos 14 e 18 DG. (Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, para Anova de uma via post hoc SNK. # $P < 0,05$, para teste t de Student. DG = dias de gestação; DB = decídua basal; JZ= Zona Juncional; LZ= Zona de labirinto; SpT= Espongiotrofoblasto; Gly= Células de glicogênio; TGC = Células gigantes trofoblástica; PAS = Ácido Periódico de Schiff; TB = trofoblasto; MBS = Espaço Vascular Materno. Barra vermelha = Membrana intravascular. Barra= 50µm

911 *O tratamento materno com Kp10 melhora a desregulação em Glut1 placentária causada pelo*
912 *hipotireoidismo em ratas*

913 Considerando a redução do peso fetal e placentário decorrente do HM e que a
914 disponibilização placentária de glicose para o feto é um dos fatores-chaves para o crescimento
915 fetal adequado (NEWBERN; FREEMARK, 2011), avaliamos a expressão placentária do
916 transportador de glicose Glut1, como também a expressão de hormônios placentários
917 envolvidos na disponibilização energética para o feto, como PL-II, rPRL e Leptina. A
918 imunomarcagem de Glut1 na placenta foi discreta, sendo mais evidente na zona de labirinto,
919 principalmente aos 18 DG (Figura 4A e D). Aos 14 DG, o HM reduziu a imunomarcagem de
920 Glut1 na zona de labirinto ($P < 0,01$), e o tratamento com Kp10 não afetou essa alteração ($P >$
921 $0,05$), enquanto não foram observadas diferenças significativas na zona juncional ($P > 0,05$;
922 Figura 4B). Em relação à expressão gênica no 14º DG, não foram observadas diferenças
923 significativas na expressão de *Glut1*, *Plii*, *rPrl* e *Leptin* entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 4C).

924 Aos 18 DG, o HM aumentou a imunomarcagem de Glut1 na zona juncional e na zona de
925 labirinto quando comparado ao controle ($P < 0,0001$, $P < 0,05$). Por outro lado, o tratamento
926 com Kp10 reduziu a imunomarcagem de Glut1 na zona juncional causada pelo HM ($P < 0,01$),
927 mas ainda manteve maior que o controle ($P < 0,01$). Na zona de labirinto, o grupo Kp10 não
928 teve diferenças significativas em relação aos demais grupos ($P > 0,05$; Figura 4E). No entanto,
929 na quantificação de transcritos gênicos, foi observado que o tratamento com Kp10 aumentou a
930 expressão de *Glut1* comparado aos grupos controle e hipotireoideo ($P < 0,05$; Figura 4F),
931 enquanto não foram observadas diferenças na expressão de *Plii*, *rPrl* e *Leptin* ($P > 0,05$).

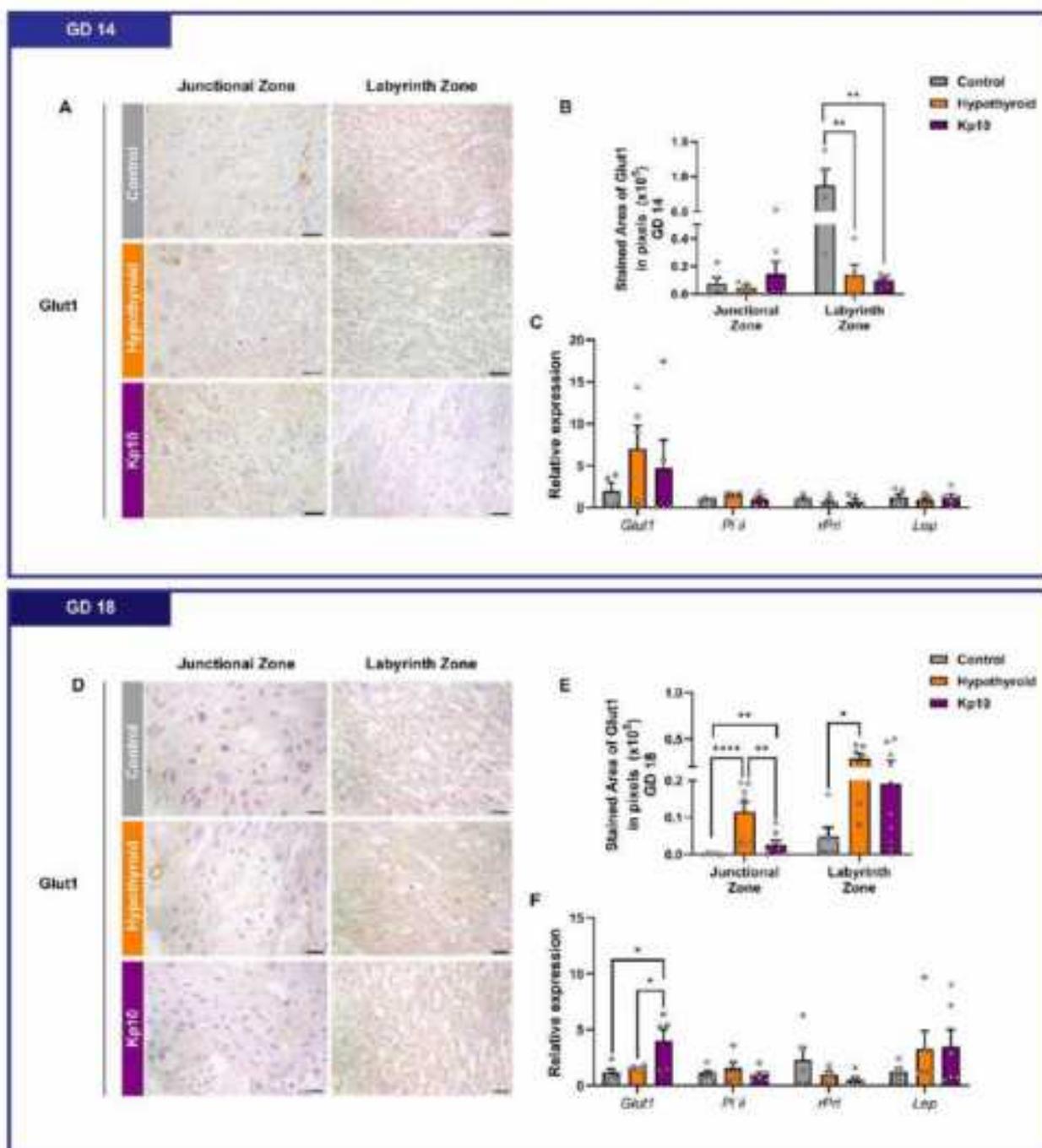


Figura 4 Avaliação da expressão de Glut1 e fatores hormonais em placentas de ratos controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 na placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de Glut1 aos 14 DG. C) Expressão gênica de *Glut1*, *Pl ii*, *rPrl* e *Leptina* aos 14 DG. D) Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). E) Área de imunomarcção em pixels da expressão de Glut1 aos 18 DG. F) Expressão gênica de *Glut1*, *Pl ii*, *rPrl* e *Leptina* aos 18 DG. (Média \pm SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, para Anova de uma via post hoc SNK. DG = dias de gestação. Barra= 50 μ m

933 *O hipotireoidismo materno aumenta a expressão placentária de INSR β em ratas, enquanto*
934 *Kp10 regula positivamente a expressão de IGF1/IGF1r.*

935 Uma vez que houve desregulação da expressão placentária de Glut1 nos animais
936 hipotireoideos, avaliou-se o sistema INSR/IGF1/IGF1r, chave para a sinalização energética e o
937 crescimento e desenvolvimento feto-placentário (HIDEN et al., 2009; SFERRUZZI-PERRI et
938 al., 2017). A imunomarcação do INSR β na placenta foi citoplasmática e heterogênea, sendo
939 mais evidente nos espongiotrofoblasto e células gigantes, principalmente aos 14 DG (Figura
940 5A e F). Já o IGF1r, a marcação foi predominantemente nuclear na zona juncional, enquanto
941 na zona de labirinto foi nuclear e citoplasmática, com acentuada redução aos 18 DG comparado
942 aos 14 DG (Figura 5C e H).

943 Aos 14 DG, o HM aumentou a marcação de INSR β em ambas as camadas da placenta
944 ($P < 0,001$, $P < 0,01$) e o tratamento com Kp10 não alterou essa maior expressão ($P > 0,05$;
945 Figura 5B). Quanto ao IGF1r, o HM não apresentou diferenças significativas em relação ao
946 controle ($P > 0,05$). O tratamento com Kp10, por outro lado, aumentou a imunomarcação na
947 zona juncional e zona de labirinto comparado aos grupos hipotireoideo e controle,
948 respectivamente ($P < 0,05$; Figura 5D). Em relação aos transcritos gênicos, foi observado
949 aumento da expressão de *Igf1* no grupo hipotireoideo em relação ao controle ($P < 0,05$),
950 enquanto o tratamento com Kp10 não apresentou diferença significativa em relação aos demais
951 grupos ($P > 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *Insr*, *Igf1r*
952 e *Irs1* entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 5E).

953 Aos 18 DG, apesar de não observar diferenças significativas na área de imunomarcação
954 de INSR β e IGF1r ($P > 0,05$; Figura 5G e I), redução acentuada de IGF1r foi observada nos
955 grupos hipotireoideo e tratado com Kp10 comparado ao controle, uma vez que a expressão foi
956 fraca a ausente. Na análise da expressão gênica, o tratamento materno com Kp10 aumentou a
957 expressão de *Igf1r* em relação ao grupo controle ($P < 0,05$), e apresentou maior expressão de
958 *Igf1* em relação aos demais grupos ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas
959 na expressão de *Insr* e *Irs1* ($P > 0,05$; Figura 5J). Em conjunto, esses resultados demonstram
960 que apesar do tratamento com Kp10 não alterar a maior expressão placentária de INSR β
961 causada pelo hipotireoidismo, ele foi capaz de estimular a expressão de IGF1r aos 14DG e de
962 *Igf1/Igf1r* aos 18 DG.

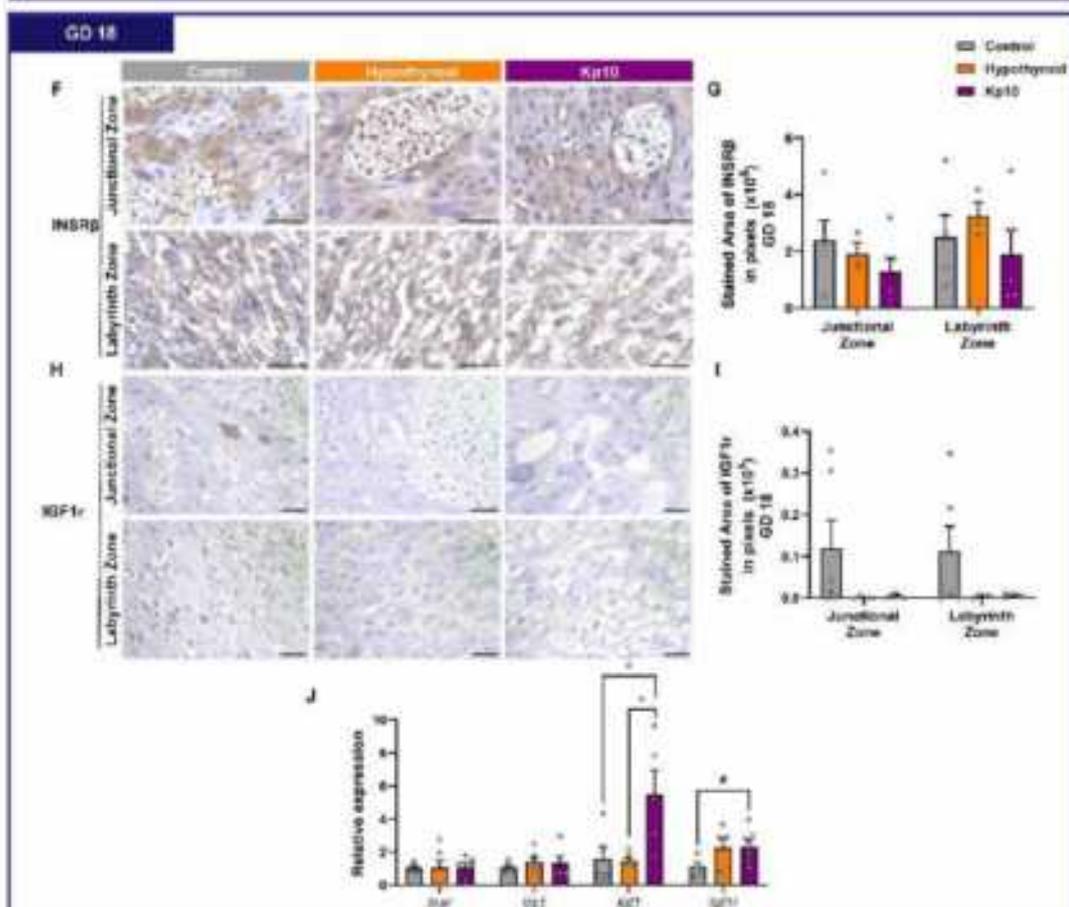
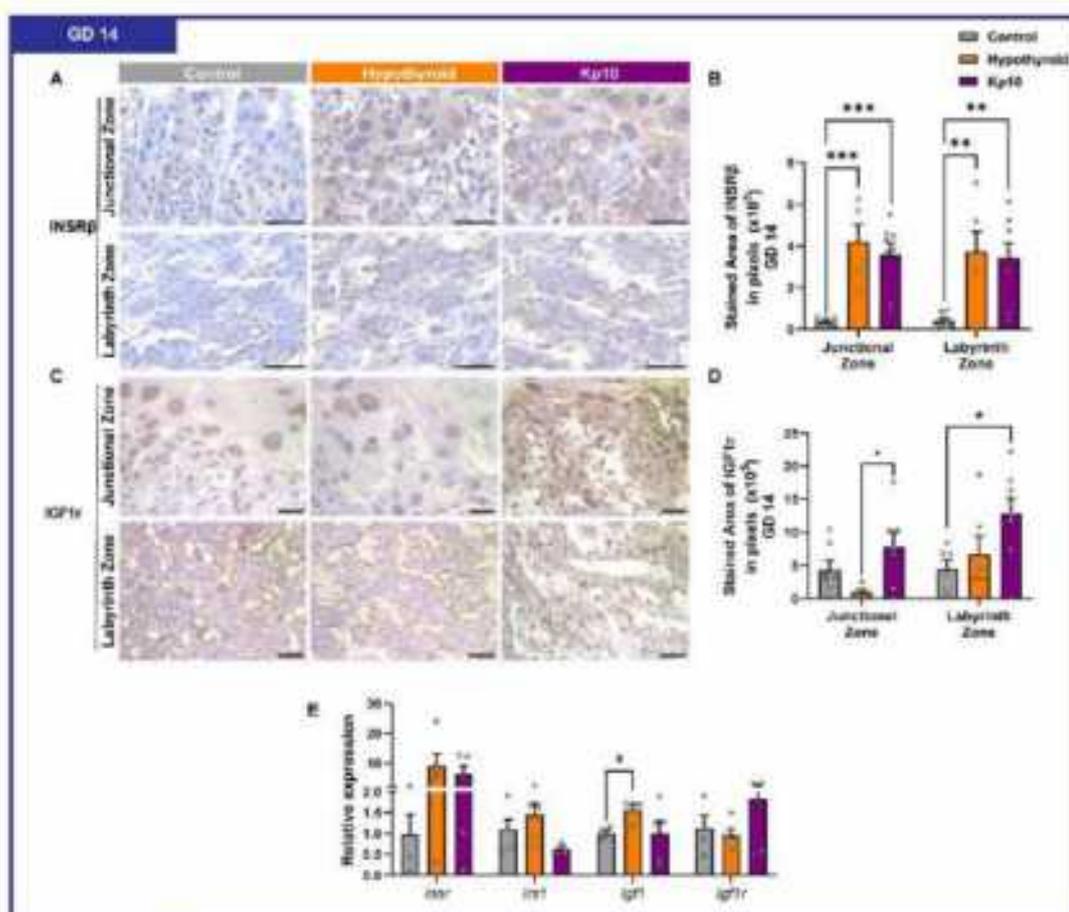


Figura 5 Avaliação da expressão do sistema INSR/IGF1/IGF1R em placentas de ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Fotomicrografias da imunomarcção de INSR β na placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de INSR β aos 14 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1r na placenta aos 14 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de IGF1r aos 14 DG. E) Expressão gênica de *Insr*, *Irs1*, *Igfl* e *Igflr* aos 14 DG. F) Fotomicrografias da imunomarcção de INSR β na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). G) Área de imunomarcção em pixels da expressão de INSR β aos 18 DG. H) Fotomicrografias da imunomarcção de IGF1r na placenta aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). I) Área de imunomarcção em pixels da expressão de IGF1r aos 18 DG. J) Expressão gênica de *Insr*, *Irs1*, *Igfl* e *Igflr* aos 18 DG. (Média \pm SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, para Anova de uma via post hoc SNK; # $P < 0,05$, para teste t de Student. DG = dias de gestação. Barra= 50 μ m

964

965 *O tratamento materno com Kp10 reverteu a desregulação placentária de AKT/mTOR causada*
966 *pelo hipotireoidismo em ratas aos 14 DG*

967 Visto que a sinalização de mTOR está associada à regulação metabólica glicêmica e é
968 considerada como sensor nutricional na placenta (ROOS; POWELL; JANSSON, 2009), foi
969 feita a avaliação da sinalização de mTOR (AKT, p-mTOR/*mTor* e *Raptor*). A imunomarcção
970 de AKT, uma proteína montante a ativação de mTOR, foi citoplasmática, heterogênea e
971 principalmente nas células gigantes e trofoblastos do labirinto, com maior expressão aos 14 DG
972 comparado aos 18 DG (Figura 6A e F). Curiosamente, o HM aumentou a área de
973 imunomarcção de AKT na zona de labirinto comparado ao controle ($P < 0,0001$), enquanto o
974 tratamento materno com Kp10 reestabeleceu a imunomarcção, igualando ao controle ($P >$
975 $0,05$). Na zona juncional não houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 6B).

976 A imunomarcção de p-mTOR, por outro lado, foi nuclear, homogênea e intensa em
977 toda a placenta aos 14 DG, com exceção do grupo hipotireoideo, enquanto teve uma redução
978 da expressão aos 18 DG (Figura 6C e H). Interessantemente, aos 14 DG, o HM reduziu a
979 imunomarcção de p-mTOR na zona juncional ($P < 0,05$). O grupo tratado com Kp10, por
980 outro lado, não apresentou diferenças significativas em relação aos demais grupos ($P > 0,05$).
981 Não foram observadas diferenças significativas na zona de labirinto ($P > 0,05$; Figura 6D). Na
982 avaliação da expressão gênica placentária de *mTor*, semelhante a imunomarcção, o HM
983 também reduziu a sua expressão comparado ao controle ($P < 0,05$), e o tratamento com Kp10
984 reverteu a expressão ($P < 0,05$), igualando controle ($P > 0,05$; Figura 6E). Adicionalmente, o
985 tratamento com Kp10 reduziu a expressão de *Raptor* comparado ao grupo hipotireoideo ($P <$
986 $0,05$), enquanto não teve diferença significativa em relação ao controle ($P > 0,05$; Figura 6E).

987 Aos 18 DG, não foram observadas diferenças significativas na imunomarcção de AKT
988 ($P > 0,05$; Figura 6G). Por outro lado, para p-mTOR, o HM reduziu a imunomarcção na zona

989 de labirinto comparado ao controle ($P < 0,05$) e o tratamento com Kp10 não alterou essa
990 redução ($P > 0,05$; Figura 6I). Não foram observadas diferenças significativas na
991 imunomarcção na zona juncional e nem nos transcritos de *mTor* e *Raptor* entre os grupos (P
992 $> 0,05$; Figura 6I e J).

993

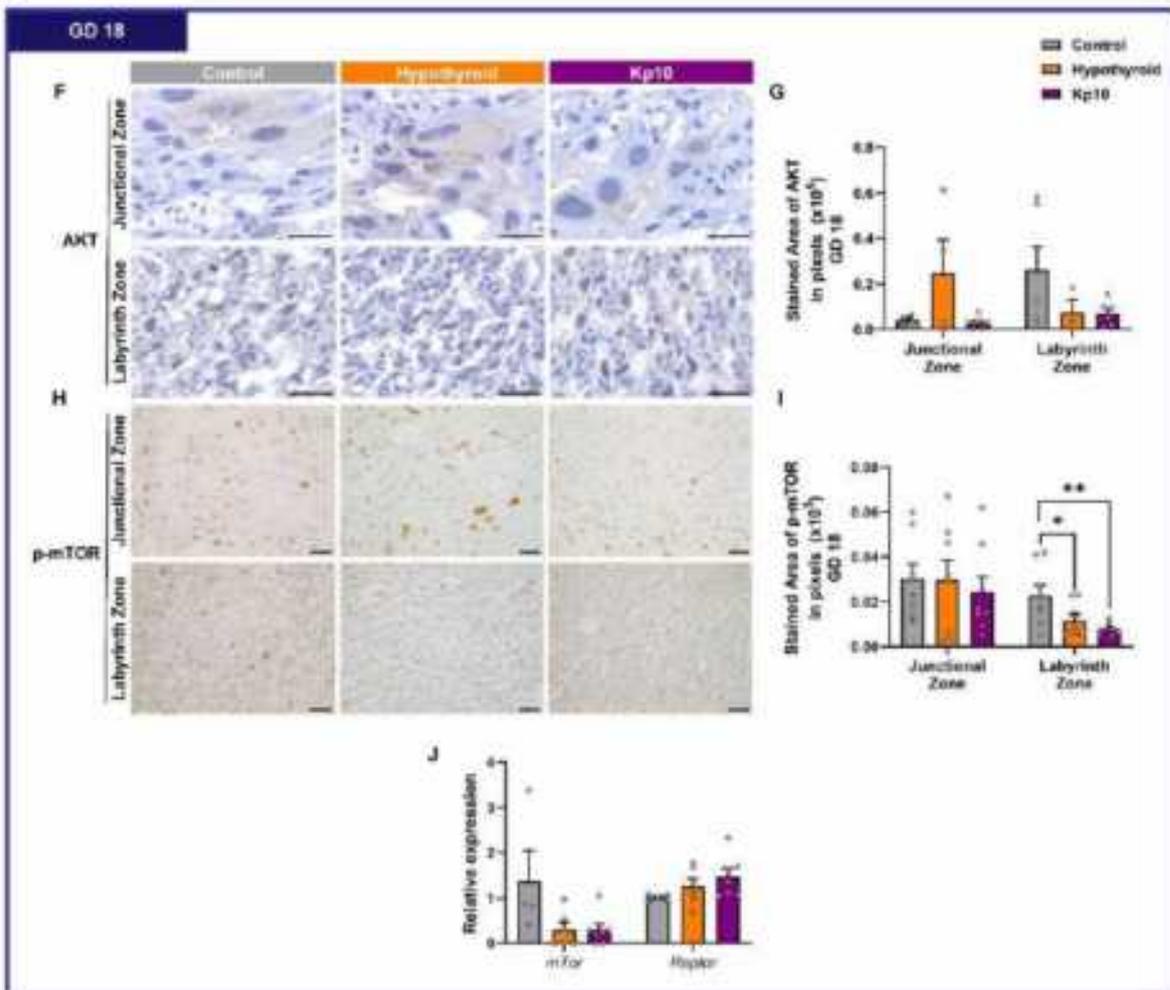
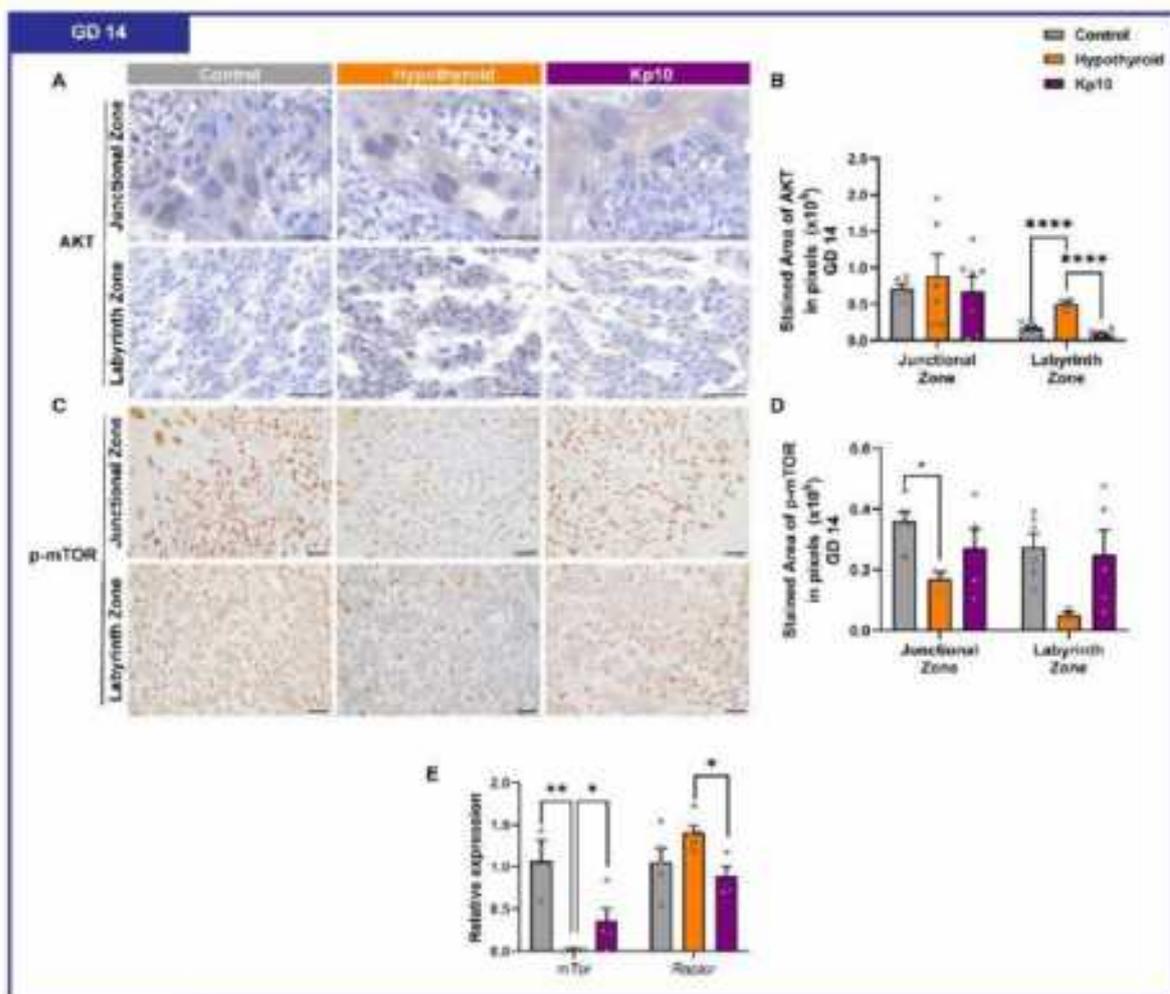


Figura 6 Avaliação da sinalização AKT/ mTOR em placentas de ratas controle, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Fotomicrografias da imunomarcção de AKT na placenta aos 14 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de AKT aos 14 GD. C) Fotomicrografias da imunomarcção de p-mTOR na placenta aos 14 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de p-mTOR aos 14 GD. E) Expressão gênica de *mTor* e *Raptor* aos 14 GD. F) Fotomicrografias da imunomarcção de AKT na placenta aos 18 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). G) Área de imunomarcção em pixels da expressão de AKT aos 18 GD. H) Fotomicrografias da imunomarcção de p-mTOR na placenta aos 18 GD (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). I) Área de imunomarcção em pixels da expressão de p-mTOR aos 18 GD. J) Expressão gênica de *mTor* e *Raptor* aos 18 GD. (Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. GD = dias de gestação. Barra= 50µm

995

996 **5.4. DISCUSSÃO**

997

998 Este estudo demonstrou que a disfunção glicêmica e restrição feto-placentária causadas
 999 pelo hipotireoidismo materno em ratas estão associadas a desregulação da expressão placentária
 1000 de Glut1/INSR β e da sinalização AKT/mTOR. O tratamento materno com Kp10, por outro
 1001 lado, não somente melhorou a expressão de Glut1 e a sinalização placentária AKT/mTOR
 1002 nesses animais, como estimulou a expressão do sistema IGF1/IGF1r, sugerindo novas vias pelas
 1003 quais a kisspeptina melhora o desenvolvimento fetal e pós-natal da prole de ratas hipotireoideas
 1004 (SANTOS et al., 2022c; dados não publicados).

1005 Nas ratas gestantes, durante os testes de tolerância, observamos que o hipotireoidismo
 1006 materno aumentou a glicemia em jejum e diminuiu a tolerância à glicose, além de reduzir a
 1007 insulina plasmática e a concentração de HDL, alterações semelhantes às observadas em ratas
 1008 gestantes tratadas com metimazol, uma droga antitireoidiana (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022),
 1009 como também em mulheres gestantes com hipotireoidismo (XU; ZHONG, 2022). Vale
 1010 ressaltar que, durante a gestação, ocorre uma adaptação do metabolismo materno sob influência
 1011 dos hormônios placentários, resultando em um ambiente de baixa sensibilidade à insulina,
 1012 estratégia que visa direcionar maior aporte de glicose para o crescimento fetal (NEWBERN;
 1013 FREEMARK, 2011). Desse modo, a falha no estabelecimento desse ambiente insulino-
 1014 resistente pode estar envolvida na disfunção glicêmica apresentada pelas ratas gestantes
 1015 hipotireoideas, uma vez que ratas hipotireoideas não gestantes não apresentam intolerância a
 1016 glicose (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022). Disfunção glicêmica durante a gestação compromete
 1017 a nutrição fetal (BRETT et al., 2014; PEREZ-RAMIREZ et al., 2024; STERN et al., 2021)e
 1018 pode ser uma das causas da restrição feto-placentária e menor massa corporal da prole neonatal
 1019 observadas nas ratas hipotireoideas deste estudo.

1020 O tratamento com Kp10, por outro lado, não foi capaz de melhorar a disfunção glicêmica
1021 causada pelo hipotireoidismo nas ratas. Diversos estudos já demonstraram os efeitos da
1022 kisspeptina na secreção de insulina, regulação da glicemia e nos mecanismos adaptativos das
1023 células β pancreáticas durante a gestação (ANDREOZZI et al., 2017; BOWE et al., 2009, 2019;
1024 HAUGE-EVANS et al., 2006; IZZI-ENGBEAYA et al., 2018; IZZI-ENGBEAYA; HILL;
1025 BOWE, 2019; MUSA; MATJILA; LEVITT, 2021; SCHWETZ; REISSAUS; PISTON, 2014;
1026 TOLSON et al., 2014; WAHAB; RIAZ; SHAHAB, 2011). Em ratos, a administração de
1027 kisspeptina estimula a secreção de insulina sem alterar a glicemia (BOWE et al., 2009). Já
1028 estudos *in vitro* com ilhotas pancreáticas de camundongo demonstraram que o estímulo da
1029 secreção de insulina pela kisspeptina ocorre somente após o estímulo com glicose (BOWE et
1030 al., 2009; HAUGE-EVANS et al., 2006). Em camundongos não gestantes, a exposição
1031 prolongada à Kp10 melhora a glicemia ao longo do TTIPG, ao mesmo tempo que a
1032 administração do antagonista da kisspeptina (Kp234) ou a deleção do gene *Kiss1r* no pâncreas,
1033 comprometem a tolerância à glicose dos animais aos 16 DG (BOWE et al., 2019). Assim,
1034 considerando que a meia-vida plasmática da Kp10 é curta (~4 min) (JAYASENA et al., 2011;
1035 LIU et al., 2013) e que seu efeito sobre a secreção de insulina induzida por glicose ocorre logo
1036 após sua infusão (BOWE et al., 2009; HAUGE-EVANS et al., 2006), a ausência de alteração
1037 na glicemia do grupo tratado com Kp10 observada no presente estudo pode ser explicada pelo
1038 fato da administração de Kp10 ter ocorrido cerca de 4 horas antes do TTIPG. Assim, é plausível
1039 que uma administração de Kp10 entre 0 e 30 minutos após o desafio glicêmico no TTIPG
1040 influencie os valores de glicemia nos animais, embora mais estudos sejam necessários para
1041 confirmar essa hipótese.

1042 Uma vez confirmada a intolerância à glicose, avaliou-se o pâncreas materno para
1043 verificar se havia falha na expansão das ilhotas pancreáticas que justificasse esse quadro.
1044 Contudo, não foram observadas alterações no pâncreas em decorrência do hipotireoidismo
1045 materno. KENT; ATLURI; CUFFE (2022) também demonstraram a ausência de alterações na
1046 massa pancreática e na massa de células β em condições de hipotireoidismo severo durante a
1047 gestação de ratas. No entanto, o mesmo estudo demonstrou redução da expressão de Glut4 e de
1048 mediadores da sensibilidade à insulina no músculo e tecido adiposo dos animais (KENT;
1049 ATLURI; CUFFE, 2022). Isso pode comprometer a captação de glicose pelos tecidos
1050 periféricos e justificar o aumento da glicemia plasmática circulante observada no presente
1051 estudo.

1052 A redução da massa corporal fetal e placentária observada nas ratas hipotireoideas,
1053 acompanhada da diminuição das dimensões das zonas placentárias e aumento da população de

1054 células de glicogênio na zona juncional, são características do quadro de hipotireoidismo
1055 materno em ratas, conforme descrito em estudos anteriores (DOS ANJOS CORDEIRO et al.,
1056 2024; SANTOS et al., 2022b, 2022c; SILVA et al., 2012). No entanto, a redução da espessura
1057 da barreira interhemal causada pelo hipotireoidismo aos 14 DG ainda não tinha sido descrita,
1058 sugerindo outra causa para a RCIU observada nestes animais, pois pode comprometer a
1059 disponibilização adequada de nutrientes para o feto e expô-lo a metabólitos tóxicos maternos
1060 (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; BURTON; JAUNIAUX, 2018; PEREZ-
1061 RAMIREZ et al., 2024).

1062 Embora o tratamento com Kp10 não tenha sido capaz de restaurar o crescimento feto-
1063 placentário das ratas hipotireoideas, inclusive a menor espessura da barreira interhemal, ele
1064 restabeleceu a população de células de glicogênio na zona juncional, como também
1065 demonstrado em nosso estudo prévio (SANTOS et al., 2022c), e teve uma tendência de melhora
1066 na massa corporal da prole fêmea neonatal. Isso pode sugerir uma melhora da função
1067 metabólica placentária causada pela Kp10, uma vez que a zona juncional é a principal camada
1068 da placenta responsável pela produção dos hormônios placentários, que são essenciais para o
1069 desenvolvimento fetal e pós-natal adequado (FOWDEN et al., 2008; KRAMER et al., 2023).
1070 Neste sentido, o presente estudo demonstrou que o hipotireoidismo materno desregulou a
1071 expressão placentária de Glut1, resultando em uma redução aos 14 DG, período de início do
1072 crescimento exponencial do feto (MU et al., 2008), seguido de um aumento da expressão aos
1073 18 DG. A desregulação da expressão placentária de Glut1 já foi observada em outras doenças
1074 gestacionais que culminam em RCIU, como demonstrado em modelos de
1075 hiperadrenocorticismo iatrogênico (LANGDOWN; SUGDEN, 2001) e hipotireoidismo em
1076 ratas (KENT et al., 2023), como também na placenta de mulheres com pré-eclâmpsia (PEI et
1077 al., 2024).

1078 O aumento da expressão de Glut1 no terço final da gestação das ratas hipotireoideas
1079 pode sugerir um mecanismo compensatório à redução de Glut1 aos 14 DG, como uma tentativa
1080 de garantir o suprimento adequado de glicose para o desenvolvimento fetal. O aumento da
1081 expressão do receptor de insulina, $INSR\beta$, como também de *Igf1*, acompanhado de seu
1082 sinalizador comum *downstream* AKT, também pode indicar um mecanismo compensatório
1083 para aumentar a captação de glicose na placenta, uma vez que AKT também estimula essa
1084 captação (BAUMANN et al., 2014; YOON, 2017). Vale ressaltar que apesar de não ter
1085 apresentado diferença significativa, as ratas hipotireoideas apresentaram redução visível da
1086 imunomarcação de IGF1r, e essa redução pode justificar o aumento compensatório na expressão
1087 de *Igf1*, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese.

1088 Uma vez que o mTOR é considerado um sensor das oscilações nutricionais na placenta
1089 (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; ROOS; POWELL; JANSSON, 2009), a
1090 redução da expressão de mTOR nas placentas das ratas hipotireoideas pode sinalizar uma
1091 resposta à restrição de nutrientes, evidenciada pela diminuição de Glut1, e de aminoácidos,
1092 como observado em estudo anterior em ratas gestantes hipotireoideas (KENT et al., 2023).
1093 Além disso, a redução de mTOR placentário é característica de doenças gestacionais associadas
1094 à RCIU, como demonstrado em modelos de diabetes gestacional em ratas (XU et al., 2020), e
1095 em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia e RCIU (HUNG; WU; CHEN, 2021; TSAI et al.,
1096 2021). Contudo, este é o primeiro estudo a demonstrar redução da expressão placentária de
1097 mTOR na condição de hipotireoidismo materno. O aumento na expressão placentária de AKT
1098 nos animais hipotireoideos também pode ser uma resposta compensatória à redução de mTOR,
1099 uma vez que AKT estimula a ativação de mTOR após sinalização de insulina e IGF1
1100 (O'REILLY et al., 2006; SAXTON; SABATINI, 2017; VADLAKONDA et al., 2013).

1101 O tratamento materno com Kp10, interessantemente, restaurou a expressão placentária
1102 de mTOR na placenta das ratas hipotireoideas aos 14 DG. Embora mais estudos sejam
1103 necessários para demonstrar o efeito da Kp10 sobre a sinalização de mTOR, um estudo *in vitro*
1104 sugeriu o papel da Kp10 em ativar a via mTOR em células epiteliais mamárias bovinas (CAO
1105 et al., 2021), enquanto estudo recente do nosso grupo demonstrou o potencial da Kp10 em
1106 aumentar a expressão hepática fetal de mTOR em ratas com hipotireoidismo materno, além de
1107 regular positivamente a expressão hepática fetal de Glut1 e a expressão hepática de *Igf1/Igf1r*
1108 na prole fêmea neonatal (dados não publicados), corroborando com a melhora da massa
1109 corpórea neonatal da prole fêmea observada no presente estudo. Em conjunto, todos esses
1110 estudos sugerem o potencial da kisspeptina em regular positivamente a sinalização tecidual de
1111 mTOR.

1112 No entanto, além da possibilidade da regulação direta de kisspeptina sobre a via mTOR,
1113 é possível que também ocorra de forma indireta, uma vez que o estresse oxidativo inibe a
1114 sinalização de mTOR (SAXTON; SABATINI, 2017) e estudos prévios já demonstraram o
1115 potencial antioxidante da Kp10 na disfunção placentária de ratas com hipotireoidismo materno
1116 (DOS ANJOS CORDEIRO et al., 2022; SANTOS et al., 2022c, 2023a). É importante ressaltar
1117 que o tratamento com Kp10 também aumentou a expressão placentária de IGF1r aos 14 DG e
1118 de *Igf1/Igf1r* aos 18 DG, que pode ser reflexo do aumento observado em mTOR, uma vez que
1119 são sinalizadores dessa via (ARDESTANI; MAEDLER, 2018; SAXTON; SABATINI, 2017),
1120 além de serem diretamente associados à expressão de Glut1 (BAUMANN et al., 2014). Isso

1121 também corrobora para o aumento de *Glut1* observado na placenta do grupo tratado com Kp10
1122 do presente estudo.

1123 Apesar do aumento da sinalização de mTOR e de *Igf1/IGF1r/Igf1r* decorrente do
1124 tratamento com Kp10 não ter sido suficiente para atenuar as alterações na massa fetal e na
1125 morfologia placentária, as adaptações moleculares podem mitigar os insultos causados por essa
1126 endocrinopatia, uma vez que há bloqueio do estresse oxidativo (SANTOS et al., 2022c) e da
1127 piroptose (SANTOS et al., 2023a) na placenta de ratas com hipotireoidismo materno após
1128 tratamento com Kp10. É importante ressaltar que a sinalização de mTOR também está
1129 envolvida na sinalização mitocondrial e resposta a estresses por coordenar a tradução das
1130 proteínas mitocondriais em resposta aos estímulos metabólicos, garantindo a produção eficiente
1131 de energia. mTOR regula a expressão do fator de transcrição PGC1, um dos principais
1132 reguladores da função e biogênese mitocondrial, além de outros fatores de transcrição como
1133 HIF1 α e ATF4, que são associados não somente a glicólise e homeostase metabólica, como na
1134 sinalização redox (BENNETT; LATORRE-MURO; PUIGSERVER, 2022; SAXTON;
1135 SABATINI, 2017). Assim, a sinalização adequada de mTOR pode favorecer a atividade
1136 antioxidante de kisspeptina e vice-versa. Além disso, deleção de mTOR placentário em
1137 camundongos está associada ao aumento da sensibilidade ao desenvolvimento de obesidade
1138 induzida por dieta (AKHAPHONG et al., 2021; BEETCH; ALEJANDRO, 2021), e verificamos
1139 recentemente que o tratamento com Kp10 em ratas com hipotireoidismo materno melhora a
1140 sinalização hepática de mTOR/IGF1/IGF1r e a programação metabólica glicêmica da prole
1141 antes e após desafio com dieta hiperlipídica (dados não publicados).

1142 Assim, os achados deste estudo demonstraram que a disfunção glicêmica e RCIU em
1143 ratas decorrentes do hipotireoidismo materno estão associadas à redução da sinalização
1144 placentária AKT/mTOR e à expressão desregulada de *Glut1/INSR β* , sendo que o tratamento
1145 com Kp10 foi capaz de atenuar essas alterações e modular positivamente a expressão
1146 placentária de IGF1/IGF1r. Este é o primeiro estudo a avaliar a via de sinalização IGF1/mTOR
1147 na placenta de ratas hipotireoideas e identificou novas vias de atuação da kisspeptina na
1148 fisiologia placentária.

1149

1150

1151 **6. CAPÍTULO 2:**

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159 **TRATAMENTO MATERNO COM KISSPEPTINA EM RATAS HIPOTIREOIDEAS**

1160 **RESTABELECE O DESENVOLVIMENTO FETO-PLACENTARIO DA PROLE F1 E**

1161 **A EXPRESSÃO PLACENTÁRIA DE mTOR, IGF1 e rPRL**

1162

1163 **TRATAMENTO MATERNO COM KISSPEPTINA EM RATAS HIPOTIREOIDEAS**
1164 **RESTABELECE O DESENVOLVIMENTO FETO-PLACENTARIO DA PROLE F1 E**
1165 **A EXPRESSÃO PLACENTÁRIA DE mTOR, IGF1 e rPRL**

1166

1167

RESUMO

1168

1169 Doenças metabólicas maternas, como diabetes mellitus gestacional e obesidade, estão
1170 associadas a falhas transgeracionais no desenvolvimento feto-placentário. No entanto, não há
1171 estudos relacionados ao hipotireoidismo materno (HM). Uma vez que a kisspeptina (Kp)
1172 modula o metabolismo glicêmico materno, placentário e fetal, e que sua administração exógena
1173 em ratas com HM foi capaz de melhorar o desenvolvimento feto-placentário e o metabolismo
1174 placentário, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do HM e da administração de
1175 kisspeptina-10 (Kp10) durante a gestação sobre a homeostase glicêmica da prole F1 gestante,
1176 bem como o desenvolvimento feto-placentário e o metabolismo placentário da prole F2. O HM
1177 reduziu a glicemia aleatória de ratas F1 gestantes, diminuiu a espessura da zona juncional,
1178 deslocou a curva de distribuição de massa corporal para a direita, e aumentou a expressão de
1179 rPRL, IGF1 e p-mTOR na interface materno-fetal das ratas F1 gestantes. Por outro lado, o
1180 tratamento materno com Kp10 na geração F0 acelerou o ganho de massa corporal materna e
1181 aumentou a concentração plasmática de T4 livre, além de impedir a redução da glicemia
1182 aleatória nas ratas F1 gestantes. Além disso, restabeleceu a espessura da zona juncional,
1183 melhorou a distribuição da massa corporal dos fetos F2, aumentou a expressão de *Plii* em
1184 placentas F2 e restabeleceu a expressão de rPRL, IGF1 e p-mTOR na interface materno-fetal.
1185 Conclui-se que o tratamento materno com Kp10 na geração F0 de ratas hipotireoideas melhora
1186 o desenvolvimento feto-placentário da prole F1 e restabelece a expressão de rPRL, IGF1 e p-
1187 mTOR na interface materno-fetal, sugerindo que os efeitos da administração materna de Kp10
1188 é transmitida ao longo das gerações.

1189

1190

1191

1192 **Palavras-chaves:** DOHaD; Intergeracional; Kiss1; LGA; RCIU; Tireoide; RCIU.

1193

1194 6.1. INTRODUÇÃO

1195

1196 O hipotireoidismo materno é uma das principais endocrinopatias que afetam a gestação
1197 e resulta em uma série de complicações tanto para a mãe quanto para a prole, incluindo
1198 disfunção placentária e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (SILVA; OCARINO;
1199 SERAKIDES, 2018; SULLIVAN, 2019). Além disso, favorece o desenvolvimento de
1200 disfunções metabólicas (KEMKEM et al., 2020; TAPIA-MARTÍNEZ et al., 2019),
1201 cardiovasculares (GODOY et al., 2014; MIAO et al., 2021), neurocognitivas (GE et al., 2020)
1202 e reprodutivas na prole adulta (KOBAYASHI et al., 2014; PANAHANDERH et al., 2022). No
1203 entanto, não há estudos avaliando os efeitos intergeracionais do hipotireoidismo materno no
1204 metabolismo glicêmico placentário e desenvolvimento fetal da geração F2.

1205 A glicose é a principal fonte de energia durante o desenvolvimento fetal e, por isso, a
1206 manutenção da homeostase glicêmica durante a gestação é vital para o sucesso gestacional
1207 (CHAVATTE-PALMER; TARRADE, 2016; STERN et al., 2021). Estudos anteriores já
1208 demonstraram que o hipotireoidismo materno compromete a homeostase glicêmica materna
1209 (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022) e da prole fêmea durante a vida adulta (JEDDI et al., 2020).
1210 Uma das principais vias sinalizadoras do balanço energético é a via de sinalização
1211 IRS/PI3K/AKT/mTOR, e na placenta atua também como um sensor nutricional e modulador
1212 da programação metabólica fetal (AKHAPHONG et al., 2021; BURTON; FOWDEN;
1213 THORNBURG, 2016; KRAMER et al., 2023). Alterações placentárias em mTOR estão
1214 associadas a doenças gestacionais, desenvolvimento fetal alterado e sinalização de insulina
1215 comprometida na prole (AKHAPHONG et al., 2021; BEETCH et al., 2023; ROOS; POWELL;
1216 JANSSON, 2009; TSAI et al., 2021). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que
1217 a intolerância à glicose e hipoinsulinemia causadas pelo hipotireoidismo materno em ratas está
1218 associada com redução da sinalização placentária de mTOR (dados não publicados). No
1219 entanto, não há estudos avaliando se essas alterações são transmitidas para as gerações
1220 seguintes.

1221 Diante do crescente aumento das doenças crônicas e seguindo os pressupostos da
1222 Hipótese das Origens do Desenvolvimento de Saúde e Doença (*Developmental Origins of*
1223 *Health and Disease hypothesis – DOHaD*), em que postula o impacto da exposição a condições
1224 adversas durante a vida intrauterina e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças
1225 crônicas na vida adulta, tem se proposto que o uso de terapias visando melhorar a função
1226 placentária em doenças gestacionais também pode ser uma alternativa promissora para a
1227 prevenção de doenças não-transmissíveis nas gerações futuras (GLUCKMAN; HANSON,

1228 2004; HOFFMAN et al., 2021; KRAMER et al., 2023). Neste sentido, estudos prévios
1229 demonstraram que a administração de kisspeptina-10 durante a gestação em ratas com
1230 hipotireoidismo materno é capaz de melhorar o desenvolvimento fetal e o estado inflamatório
1231 e redox placentário (SANTOS et al., 2022a, 2023a), além de melhorar as vias de sinalização
1232 mTOR e IGF1/IGF1r na placenta e fígado fetal (dados não publicados), sugerindo a kisspeptina
1233 como uma potencial ferramenta terapêutica para doenças gestacionais metabólicas. Contudo,
1234 ainda não há informações se a administração materna de kisspeptina também poderia
1235 influenciar a programação reprodutiva da prole, em especial o desenvolvimento feto-
1236 placentário. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do hipotireoidismo materno e
1237 da administração de kisspeptina-10 durante a gestação sobre a homeostase glicêmica
1238 gestacional da prole F1 e o desenvolvimento feto-placentário da prole F2.

1239

1240 **6.2. MATERIAL E MÉTODOS**

1241 *Animais*

1242 Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e
1243 Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais
1244 foram mantidos em 5-6 animais/caixa e com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (12:00 h
1245 claro / 12:00 h escuro) controladas. Água e ração comercial foram fornecidos *ad libitum*. Todos
1246 os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais
1247 da UESC (CEUA N° 026/22).

1248

1249 *Delineamento experimental*

1250 As ratas (210 ± 18 g) foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n = 11) e
1251 hipotireoideo (n = 22). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária, por sonda
1252 orogástrica, de 6-propyl-2-thiouracil (PTU; 4 mg/Kg/dia; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
1253 diluído em água destilada. O tratamento iniciou-se 5 dias antes da cópula com machos saudáveis
1254 e se manteve até o final da gestação. A confirmação da cópula pela visualização de
1255 espermatozoides em citologia vaginal foi designada como 0 dia gestacional (DG). Após a
1256 confirmação, os animais hipotireoideos foram divididos nos grupos hipotireoideo (n = 11) e
1257 hipotireoideo tratado com kisspeptina-10 (Kp10; n = 11; 8 µg/Kg/dia; Tocris Bioscience,
1258 Bristol, UK). O tratamento com Kp10 foi diário, intraperitoneal, do 8° DG até o parto, enquanto
1259 os outros animais receberam água estéril como placebo (SANTOS et al., 2022c). No 18° DG,
1260 cinco animais de cada grupo foram eutanasiados para dosagem de T4 livre plasmático e

1261 confirmação da hipofunção tireoidiana.

1262 Após o parto, as ninhadas foram padronizadas em 7-8 filhotes por mãe. O desmame foi
 1263 realizado com 21 dias e 18 fêmeas F1 adultas (256 ± 11 g) foram selecionadas aleatoriamente
 1264 para compor os grupos controle-F1 (N = 6), hipotireoideo-F1 (N = 6) e hipotireoideo tratado
 1265 com Kp10-F1 (Kp10-F1; N = 6), para realização do manejo reprodutivo e acasalamento com
 1266 machos saudáveis. O restante dos animais F1 foram eutanasiados com sobredose de Xilasina
 1267 (30mg/Kg) e Ketamina (200mg/Kg) para dosagem dos níveis plasmáticos de T4 livre. Todas as
 1268 fêmeas F1 foram pesadas a cada dois dias para avaliação do percentual de ganho de massa
 1269 corporal em relação a massa corporal inicial. No 16º DG, as ratas F1 gestantes foram submetidas
 1270 aos testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e de tolerância intraperitoneal a
 1271 insulina (TTIPI). Os animais foram eutanasiados no 18º DG.

1272

1273 *Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a insulina*
 1274 *(TTIPI).*

1275 No TTIPG, após jejum por 6 horas, a glicemia basal dos animais foi avaliada entre 11:00
 1276 e 12:00, seguida da administração de glicose (2g/Kg/animal), via intraperitoneal, e posterior
 1277 avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. Em seguida, os animais foram alimentados *ad*
 1278 *libitum* por 1 hora e mantidos em jejum por 1 hora para o TTIPI. A glicemia basal foi novamente
 1279 avaliada e, logo após, aplicada insulina (0,75 UI/Kg/animal), via intraperitoneal, com posterior
 1280 avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. A glicemia foi dosada com uma gota de sangue da
 1281 ponta da cauda utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Performa, Roche, USA). O TTIPI
 1282 foi realizado no mesmo dia e com jejum de 1 hora para evitar maior estresse ao animal e por
 1283 não apresentar diferenças na glicemia basal e na curva glicêmica em relação ao teste realizado
 1284 em dia diferente (intervalo de 1 semana) e com jejum de 6 horas (DA SILVA et al., 2025;
 1285 submetido).

1286 A área sob a curva (AUC) do TTIPG e do TTIPI foram calculados seguindo a seguinte
 1287 equação (ALTMAN, 1990):

1288

$$1289 \quad AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (\text{tempo}_{i+1} - \text{tempo}_i)(\text{glicemia}_i + \text{glicemia}_{i+1})$$

1290

1291 *Necropsia e coleta de material*

1292 Aos 18 DG, no período da manhã (9:00-12:00), foram realizadas as eutanásias para a
 1293 coleta do material. Primeiramente, os animais foram pesados para a quantificação do ganho de

1294 massa corporal durante a gestação. A glicemia foi medida por uma gota de sangue da ponta da
 1295 cauda utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Performa, Roche, USA). Depois, realizou-se
 1296 a eutanásia com guilhotina para a coleta de sangue da região cervical em tubos heparinizados.
 1297 O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos e o plasma armazenado a – 20°C para
 1298 dosagem de T4 livre e insulina.

1299 Durante a necropsia, foi coletado todo o sistema genital e o pâncreas materno. Avaliou-
 1300 se a massa uterina contendo as placentas e os fetos; a massa uterina com as placentas e sem os
 1301 fetos; e a massa corporal dos fetos individualmente. Para evitar o efeito de diferentes tamanhos
 1302 de ninhada sobre o ganho de massa corporal materna, o ganho de massa materna foi obtido pela
 1303 subtração da massa corporal final histerectômica pela inicial, e a massa pancreática também foi
 1304 calculada relativo à massa corporal histerectômica da mãe. Foram também contabilizados o
 1305 número de fetos e o número de sítios com reabsorção ou morte fetal. Esses dados permitiram
 1306 estimar a massa de líquido amniótico por feto e da unidade útero-placenta, pelas seguintes
 1307 fórmulas:

$$1308$$

$$1309 \quad \text{Unidade útero – placenta (g)}: \frac{\text{Útero com Placentas (g)}}{\text{Número de Fetos}}$$

1310

1311 *Massa do líquido amniótico por feto:*

$$1312 \quad \frac{\text{Útero completo} - (\sum \text{Peso fetal} + \text{Útero com placentas})}{\text{Número de Fetos}}$$

1313

1314 Fragmentos de duas placentas de fetos viáveis de cada animal foram escolhidas
 1315 aleatoriamente e armazenados em trizol separadamente, seguido de congelamento em
 1316 nitrogênio líquido e estocagem a -80°C para análises de qRT-PCR. Os discos restantes (placenta
 1317 + decídua + triângulo metrial) e o pâncreas materno foram fixados em paraformaldeído 4% à
 1318 4°C por 24 horas e processados pela técnica de inclusão em parafina para análises
 1319 histomorfométricas e imuno-histoquímicas. Os tecidos foram desidratados em solução seriada
 1320 de álcool 70% até 100%, com posterior diafanização em xilol e impregnação e inclusão em
 1321 parafina. Cortes de 4µm dos tecidos foram obtidos por microtomia em lâminas histológicas para
 1322 avaliação histomorfométrica, enquanto lâminas polarizadas silanizadas (StarFrost Polycat,
 1323 Germany) foram utilizadas para a imuno-histoquímica.

1324

1325 *Análise hormonal*

1326 Foram feitas as dosagens de T4 livre (IMMULITE, Siemens Medical Solutions
1327 Diagnostics, Malvern, PA, USA) e insulina plasmática (EZRMI-13K Insulin ELISA; EMD
1328 Millipore Corporation, Missouri, USA) por meio de ELISA (sensibilidade: 0,4 ng/dL e 0,1
1329 ng/mL, respectivamente), usando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante.

1330

1331 *Avaliação histomorfométrica da placenta*

1332 A análise histomorfométrica da placenta foi realizada em cortes histológicos de 4 µm
1333 corados com Hematoxilina e Eosina, e cortes corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS)
1334 contracoradas com *fastgreen*. Imagens de cada disco placentário foram capturadas utilizando
1335 um estereomicroscópio Leica S9i e a espessura de cada camada da placenta (zona juncional e
1336 zona de labirinto) foi avaliada em 10 campos aleatórios e obtida a média por sítio placentário.
1337 As análises foram realizadas com o auxílio do software Image Pro Plus® versão 4.5 e os valores
1338 foram transformados para milímetros com o auxílio de uma escala micrométrica.

1339

1340 *Avaliação do desenvolvimento fetal*

1341 O cérebro, coração, fígado, pulmões e rins de cada feto foram também dissecados,
1342 pesados e foi obtido a massa relativa dos órgãos em relação à massa fetal. Após pesagens dos
1343 órgãos fetais, foi calculado a relação cérebro/fígado, um indicador de restrição de crescimento
1344 fetal assimétrica (NAPSO et al., 2019)

1345

1346 *Imuno-histoquímica*

1347 Foram utilizados os anticorpos anti-receptor de insulina β (INSRβ; 1:50; sc-711, Santa
1348 Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-IGF1 (1:100; sc-518040, Santa Cruz Biotechnology, CA,
1349 USA), anti-IGF1R (, 1:50; sc-713, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-rPRL (1:200;
1350 sc-74520, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-AKT (1:200; 9272S , Cell Signaling
1351 Technology Inc, MA , USA), anti-p-mTOR (1:200; sc-293133, Santa Cruz Biotechnology, CA,
1352 USA) e anti-GLUT1 (1:100; sc-377228, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

1353 A técnica utilizada foi a de estreptavidina-biotina-peroxidase pelo sistema de detecção
1354 Dako (EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH, (Link)). A recuperação antigênica foi realizada
1355 pelo calor em banho maria a 98°C utilizando solução de ácido cítrico com pH 6,0. Os cortes
1356 foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio (3 %; H₂O₂) com metanol (CH₃OH) por
1357 30 min para bloqueio de peroxidase endógena. Em seguida, as lâminas foram incubadas por

1358 mais 30 minutos em solução de soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp.,
1359 Fremont, CA. USA) e incubadas *overnight* com o anticorpo primário. Após lavagem em solução
1360 de fosfato tamponada (PBS, pH 7,2), foi adicionado aos cortes solução de estabilização de
1361 proteínas (EnVision™ FLEX +, Mouse (LINKER); ref. SM804), seguido de anticorpo
1362 secundário conjugado com estreptavidina peroxidase (EnVision™ FLEX/HRP; ref. SM802)
1363 por 30 min. O cromógeno utilizado foi a 3'3 diaminobenzidina (EnVision™ FLEX DAB+
1364 Chromogen; ref. DM827), diluído em tampão com H₂O₂ (EnVision™ FLEX Substrate Buffer;
1365 1:50; ref. SM803). As secções foram contracoradas com hematoxilina e o controle negativo foi
1366 obtido pela substituição do anticorpo primário por solução de fosfato tamponada (PBS) (ILIE
1367 et al., 2017; SANTOS et al., 2023a).

1368 Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da expressão imuno-histoquímica
1369 de INSR β , IGF1R, IGF1, AKT, p-mTOR, GLUT1 e rPRL nas camadas de zona juncional e
1370 labirinto placentário, além da decídua basal e triângulo metrial. Cinco imagens de cada região
1371 foram fotografadas com um Microscópio fotônico *Leica DM2500*. A área de imunomarcacão
1372 foi determinada por meio do software WCIF ImageJ® (Media Cybernetics Manufacturing,
1373 Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram feitas. Os dados
1374 de cada disco placentário foram arquivados, analisados e expressos como área de
1375 imunomarcacão em pixels (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

1376

1377 *qRT-PCR*

1378 A extração do RNA total da placenta foi realizada com Trizol (Invitrogen, Life
1379 Technologies, Carlsbad, CA, USA) conforme as instruções do fabricante. A concentração e a
1380 qualidade do RNA de cada tecido foram avaliadas com Nanodrop 2000 Spectrophotometer
1381 (Thermo scientific). Para a síntese do cDNA foi utilizado 1 μ g de RNA usando o kit comercial
1382 GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo
1383 foram quantificados pela qPCR utilizando 1,5 μ L de cDNA, 100 nM de cada iniciador e 12,5
1384 μ L do reagente GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 μ L de reação, no
1385 equipamento da Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Como controle negativo
1386 utilizou o mix de amplificação de DNA, em que a amostra de cDNA foi substituída por água.
1387 As condições para as amplificações foram: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de
1388 desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. A linearidade e a
1389 eficiência da amplificação da qPCR foram avaliadas através de curvas padrões dos transcritos
1390 geradas utilizando diluições seriadas do cDNA. Os iniciadores para *Insr*, *Isr-1*, *Igf1r*, *Igf1*,
1391 *mTor*, *Raptor*, *Glut1*, *rPrl*, *PlII* e *Lep* foram selecionados de estudos anteriores ou do *National*

1392 *Center for Biotechnology Information* (NCBI) com base na sequência do mRNA *Rattus*
 1393 *norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os
 1394 resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização
 1395 baseada na expressão de *Polr2a Rattus norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014;
 1396 SOLANO et al., 2016).

1397

1398 Tabela 1- Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores	Referência
<i>Insr</i>	F: GGCCCGATGCTGAGAACA R: CGTCATTCCAAAGTCTCCGA	(HAGHIR et al., 2013)
<i>Irs-1</i>	F: GGCACCATCTCAACAATC R: GTTTCCACCCACCATAC	(ABDELMAGEED et al., 2021)
<i>Igf1r</i>	F: CTGCTCCAAAGACAAAATACCCATC R: ACCGCACACTTCTGTCTTGG	NCBI
<i>Igf1</i>	F: ACCCGGGACGTACCAAAATG R: CGAGCTGGTAAAGGTGAGCA	(SANTOS et al., 2022c)
<i>mTor</i>	F: GATACGCCGTCATTCCTC R: TGCTCAAACACCTCCACC	(YIN et al., 2020)
<i>Raptor</i>	F: CCCTTTACACCATGCATAGCT R: GAGGGTTACCATTGTGGAAGT	(MAZUMDER; PATIAL; SINGH, 2019)
<i>Glut1(Slc2a1)</i>	F: CAATCAAACATGGAACCACCG R: CGATTGATGAGCAGGAAGCG	(GUO et al., 2020)
<i>rPrl</i>	F: GCCTCTCAAGCTAAAGGACAC R: TTTTCTTCAGGTTGGCCCCTT	NCBI
<i>PIII</i>	F: TTACCGAATGTCCACTGG R: TGCAAATCTGACCACTCAG	(LEE et al., 2003)
<i>Lep</i>	F: GTTCCTGTGGCTTTGGTCCT R: CTGGTGACAATGGTCTTGATGA	(LECOUTRE et al., 2017)
<i>Polr2a</i>	F: GCTGGACCTACTGGCATGTT R: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	(SANTOS et al., 2022b)

1399 NCBI = National Center for Biotechnology Information

1400

1401 *Análise estatística*

1402 Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e
 1403 D'Agostino-Pearson omnibus) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) dos erros (GraphPad

1404 Prism 10.1.2). Os valores médios dos grupos para massa fetal e dos órgãos fetais foram
1405 determinados através da análise de um modelo linear misto seguido do teste de Bonferroni.
1406 Nesse modelo, a mãe foi incluída como sujeito e fator aleatório, sendo o tratamento considerado
1407 como fator fixo e o tamanho da ninhada como variável de covariância (IBM SPSS Statistics for
1408 Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp) (LOPEZ-TELLO et al., 2023). A curva de
1409 distribuição da massa corporal fetal foi ajustada por regressão não-linear para distribuição
1410 Gaussiana, e avaliada por teste Qui-Quadrado. O 10º e o 90º percentis foram calculados por: (\pm
1411 Z score x desvio padrão) + média do grupo controle, assumindo o Z score = 1,282. Os demais
1412 dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste Student-Newman-
1413 Keuls (SNK). Os dados estão representados por Média \pm Erro padrão da média (SEM) e as
1414 diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

1415

1416 **6.3. RESULTADOS**

1417 *O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas acelerou o ganho de massa corporal*
1418 *materna e aumentou a concentração de T4 livre da geração F1 gestante.*

1419 Estudos demonstraram que o HM compromete a homeostase glicêmica materna e da
1420 prole, além de alterar a sinalização energética placentária (KENT et al., 2023; SANTOS et al.,
1421 dados não publicados). No entanto, não há informações se a homeostase glicêmica materna e
1422 eixo placenta-pâncreas são alterados durante a gestação das gerações futuras. Primeiramente,
1423 avaliamos o ganho de massa corporal materna da prole F1 gestante proveniente de ratas
1424 hipotireoideas F0 e que foram também tratadas com Kp10 durante a gestação. O grupo
1425 hipotireoideo F1 não apresentou alteração no ganho de massa corporal durante a gestação
1426 comparado ao controle ($P > 0,05$). No entanto, do 8º ao 10º DG, a geração F1 do grupo tratado
1427 com Kp10 acelerou o ganho de massa corporal materna quando comparado aos demais grupos
1428 ($P < 0,05$; $P < 0,01$; Figura 1A), como também foi observado na análise da AUC do ganho de
1429 massa corporal ($P < 0,05$; Figura 1B).

1430 O hipotireoidismo materno na geração F0 foi confirmado pela redução da concentração
1431 plasmática de T4 livre ($P < 0,0001$). A redução da concentração circulante de T4 livre foi
1432 observada também na geração F1 no período neonatal ($P < 0,01$), mas sem diferenças
1433 significativas quando jovens e quando gestantes ($P > 0,05$). Contudo, o tratamento materno
1434 com Kp10 na geração hipotireoidea F0 aumentou os níveis plasmáticos de T4 livre nas ratas
1435 gestantes F1 quando comparado ao controle ($P < 0,05$; Figura 1C).

1436 Aos 16 DG, não foram observadas diferenças significativas na glicemia em jejum; nas
1437 curvas de TTIPG e TTIPI, como também nas suas respectivas AUC ($P > 0,05$; Figura 1D-H).
1438 No entanto, aos 18 DG, o HM da geração F0 diminuiu a glicemia aleatória da geração F1
1439 gestante ($P < 0,05$; Figura 1I), enquanto a administração materna de Kp10 na geração F0 foi
1440 capaz de prevenir essa alteração na prole F1 gestante ($P < 0,05$). Não foram observadas
1441 diferenças significativas na dosagem de insulina plasmática ($P > 0,05$; Figura 1J). Em conjunto,
1442 a primeira geração de ratas hipotireoideas gestantes não apresentam comprometimento da
1443 tolerância a glicose e sensibilidade a insulina, apesar de reduzida glicemia aleatória, enquanto
1444 as descendentes de ratas hipotireoideas tratadas com Kp10 aceleraram o ganho de massa
1445 materno, restabeleceram os níveis de glicemia aleatória e aumentaram a concentração de T4
1446 livre.

1447

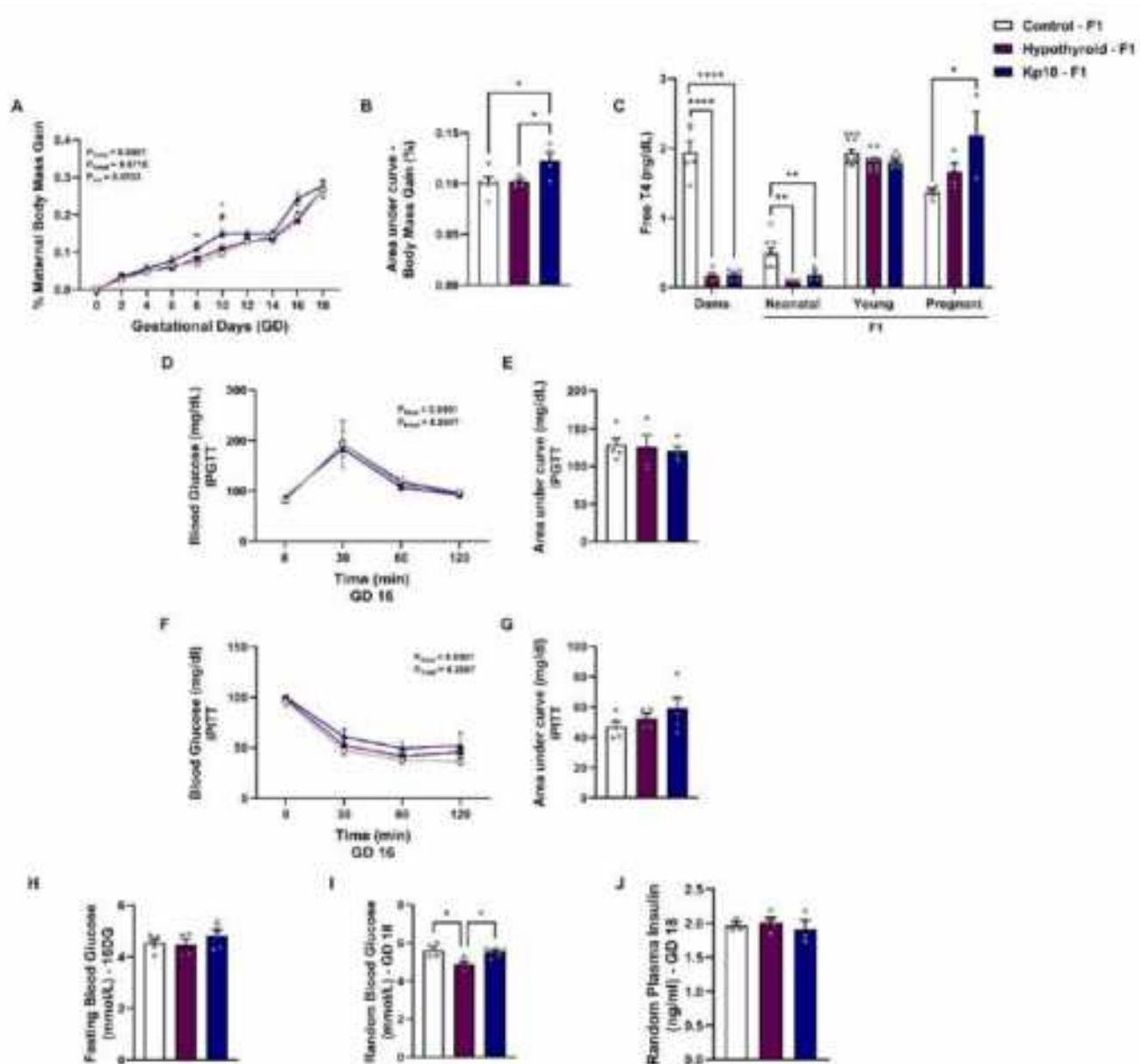


Figura 1 Avaliação da massa corporal, níveis de T4 livre e insulina e da homeostase glicêmica de ratos controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1). A) Curva de ganho de massa corporal materna. B) Área sob a curva do ganho de massa corporal materna. C) Dosagem plasmática de T4 livre. D) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos DG 16. E) Área sob a curva do TTIPG. F) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos DG 16 DG. G) Área sob a curva do TTPII. H) Glicemia em jejum aos DG 16. I) Glicemia aleatória aos DG 18. J) Insulina plasmática aleatória aos DG 18. (Anova de uma ou duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, exceto do A que * $P < 0,05$ controle-F1 vs. Kp10-F1; ** $P < 0,01$ controle-F1 vs. Kp10-F1; # $P < 0,05$ Hipotireoideo-F1 vs. Kp10-F1. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; DG = dias de gestação.

1448

1449

1450 *O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas melhora o desenvolvimento feto-*
1451 *placentário da geração F2*

1452 O HM é associado a alterações no ambiente intrauterino, além de comprometimento do
1453 desenvolvimento feto-placentário (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Apesar disso,
1454 não se sabe se essas alterações são herdadas pelas gerações futuras. O HM na geração F0 não
1455 alterou o número de fetos viáveis, a taxa de morte fetal, a massa da unidade útero-placenta e a
1456 massa do líquido amniótico nas ratas F1 gestantes ($P > 0,05$); o grupo Kp10-F1 manteve
1457 resultados similares ($P > 0,05$; Figura 2A-D). No entanto, na análise da espessura das camadas
1458 da placenta, foi observado que o HM reduziu a espessura da zona juncional em placentas F2
1459 comparado ao controle ($P < 0,05$), enquanto o tratamento materno com Kp10 na geração F0 foi
1460 capaz de prevenir a redução dessa camada ($P < 0,01$; Figura 2E).

1461 Na avaliação dos dados biométricos fetais, não foram observadas diferenças
1462 significativas no comprimento fetal, na massa corporal fetal e na massa relativa dos órgãos
1463 fetais (fígado, cérebro, coração, pulmão e rim), bem como na relação cérebro-fígado ($P > 0,05$;
1464 Figura 2G-K). Contudo, foi possível observar um deslocamento à direita da curva da prole F2
1465 das ratas hipotireoideas quando comparado à curva controle (Figura 2G). No grupo controle foi
1466 observado 80% dos fetos F2 entre a média e o 10° (40%) e 90° (40%) percentis, com 20% da
1467 população abaixo (10%) e acima (10%) do 10° e 90° percentil, respectivamente. Porém, os fetos
1468 do grupo hipotireoideo F1 teve a curva deslocada à direita (teste X^2 : $P < 0,0001$, *control -F1*
1469 *vs hypothyroid-F1*), com ausência de animais abaixo do 10° percentil, 14% dos animais entre o
1470 10° percentil e a média, 73% dos animais entre a média e o 90° percentil, e 13% acima do 90°
1471 percentil. Por outro lado, os fetos do grupo Kp10-F1 tiveram uma curva mais próxima do
1472 controle (teste X^2 : $P < 0,0019$, *control -F1 vs Kp10-F1*; $P < 0,0001$, *hypothyroid-F1 vs Kp10-*
1473 *F1*), com 1% e 2% abaixo e acima do 10° e 90° percentil, respectivamente, 43% entre o 10°
1474 percentil e a média, e 54% entre a média e o 90° percentil. Em conjunto, esses dados
1475 demonstraram que a administração materna de Kp10 em ratas hipotireoideas preveniu a redução
1476 da zona juncional placentária e melhorou a distribuição da massa fetal da geração F2.

1477

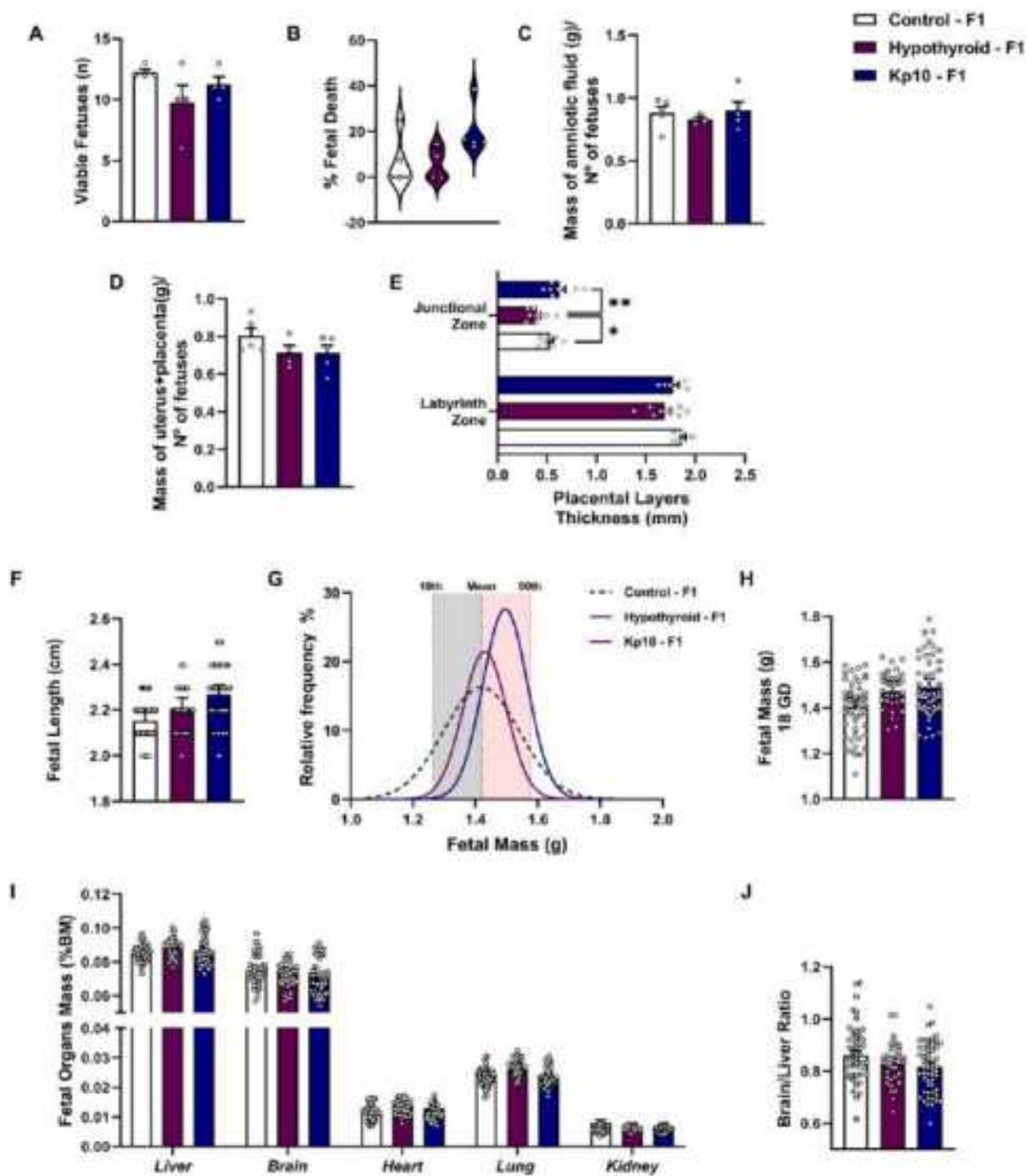


Figura 2 Parâmetros reprodutivos de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1). A) Número de fetos viáveis aos 18 DG. B) Taxa de morte fetal aos 18 DG. C) Massa estimada de líquido amniótico por feto aos 18 DG. D) Massa da unidade útero-placenta aos 18 DG. E) Espessura das camadas placentárias aos 18 DG. F) Comprimento fetal aos 18 DG. G) Curva de distribuição da massa corporal fetal aos 18 DG. H) Massa corporal fetal aos 18 DG. I) Massa relativa dos órgãos fetais aos 18 DG. J) Relação cérebro-fígado aos 18 DG. (A, C-E: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM; B: Kruskal-Wallis post hoc Dunn's; Plot de violino; F,H-J: Modelo linear misto post hoc Bonferroni; Média±SEM; G: Regressão não-linear para Distribuição Gaussiana; Mean = 1,419; 10th = 1,263; 90th = 1,575). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Nos gráficos F-J foi feita a sobreposição de gráficos da média±SEM corrigidos pelo modelo linear misto, e a distribuição individual dos fetos, no Adobe Illustrator. DG = dias de gestação.

1478

1479 *O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão de*
1480 *rPRL na interface materno-fetal da geração F1*

1481 Uma vez que a placenta é o elo entre o metabolismo fetal e materno (KRAMER et al.,
1482 2023), foi avaliada a expressão de mediadores hormonais placentários como lactogênio
1483 placentário 2 (PL-II), rPRL e leptina, e do transportador de glicose, Glut1. A imunomarcagem
1484 de Glut1 foi discreta, citoplasmática e heterogênea em toda a interface materno-fetal (triângulo
1485 metrial + decídua basal + placenta), com expressão mais evidente na zona de labirinto (Figura
1486 3A) comparada às outras regiões. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre
1487 os grupos ($P > 0,05$; Figura 3B). Já o rPRL teve expressão citoplasmática discreta a moderada
1488 em toda a interface materno-fetal (Figura 3C), sendo que o grupo hipotireoideo-F1 apresentou
1489 aumento da área marcada na decídua basal ($P < 0,05$), zona juncional ($P < 0,01$) e zona de
1490 labirinto ($P < 0,05$) comparados ao controle. O tratamento materno com Kp10 nas mães F0,
1491 interessante, preveniu esse aumento de rPRL na interface materno-fetal da prole F1
1492 causado pelo HM ($P < 0,05$), se igualando ao controle ($P > 0,05$; Figura 3D).

1493 Quanto à avaliação da expressão gênica placentária F2, foi observado que o tratamento
1494 materno com Kp10 em ratas hipotireoideas F0 aumentou a expressão de *Plii* comparado aos
1495 demais grupos ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças na expressão de *Glut1*, *rPrl* e
1496 *Leptina* ($P > 0,05$; Figura 3E).

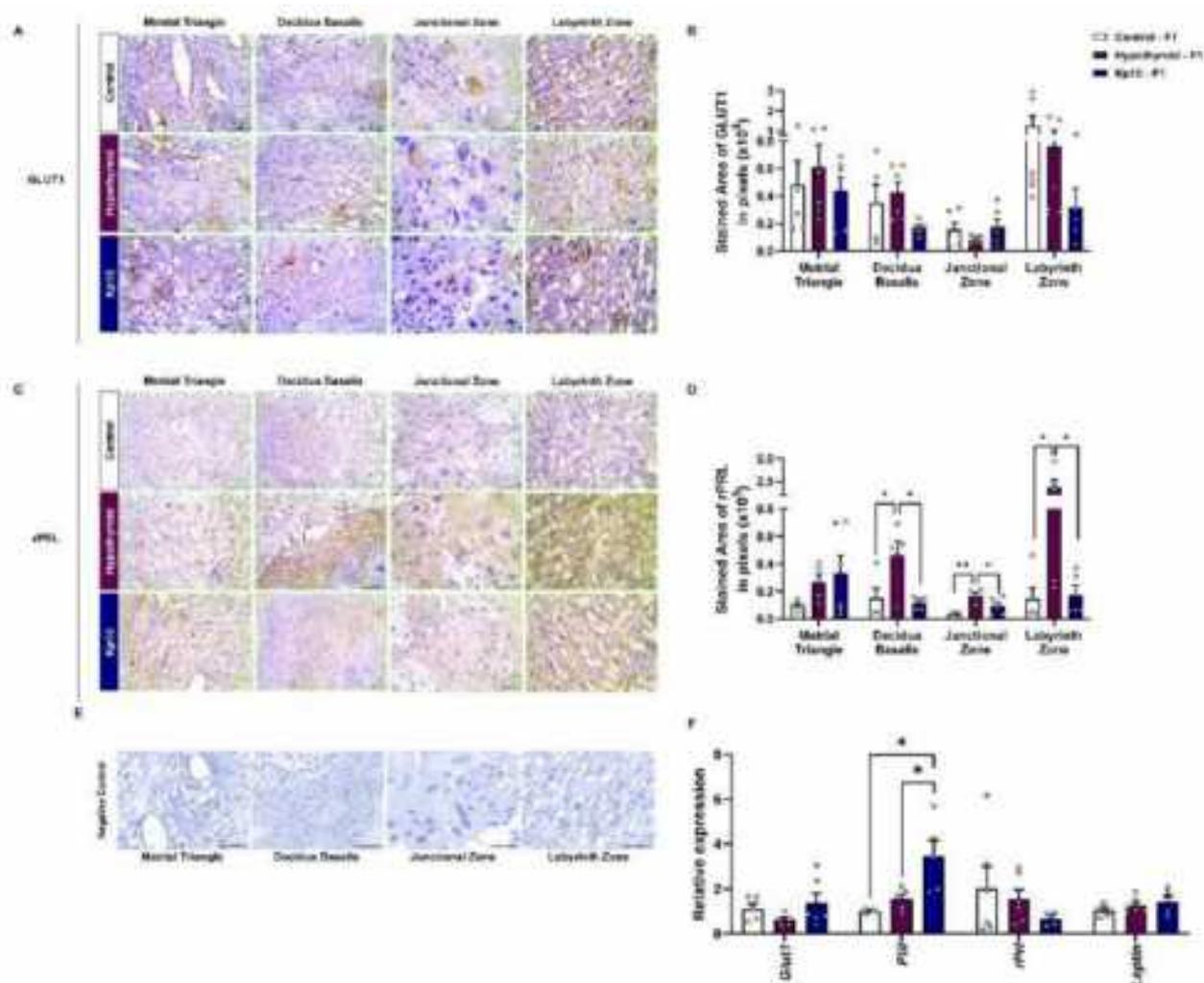


Figura 3 Avaliação de Glut1 e fatores hormonais placentários na interface materno-fetal de ratos controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1) A) Fotomicrografias da imunomarcção de Glut1 aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de Glut1 aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de rPRL aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de rPRL aos 18 DG. E) Expressão gênica de *Glut1*, *Plii*, *rPrl* e *Leptina* aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. DG = dias de gestação. Barra = 50µm.

1497

1498 *O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão de*
 1499 *IGF1 na interface materno-fetal da geração F1*

1500 Uma vez que a via IGF1/IGF1r está sob influência da sinalização glicêmica e insulínica
 1501 e modulam o desenvolvimento placentário e fetal (HIDEN et al., 2009; KINEMAN; DEL RIO-
 1502 MORENO; SARMENTO-CABRAL, 2018; SFERRUZZI-PERRI et al., 2017), avaliamos a
 1503 expressão de IGF1, IGF1r, INSRβ/*Insr* e *Irs1*. A imunomarcção de IGF1 foi homogênea e
 1504 citoplasmática em toda a interface materno-fetal da geração F1 (Figura 3A). Na avaliação da
 1505 área de imunomarcção, o HM aumentou a expressão de IGF1 em quase toda a interface

1506 materno-fetal (triângulo metrial, zona juncional e zona de labirinto) da prole F1 quando
1507 comparado ao controle ($P < 0,01$, $P < 0,0001$), exceto na decídua basal ($P > 0,05$). O grupo
1508 tratado com Kp10- F1, por outro lado, apresentou redução acentuada da imunomarcção de
1509 IGF1 no triângulo metrial ($P < 0,0001$), na zona juncional ($P < 0,01$; $P < 0,0001$), e na zona
1510 de labirinto ($P < 0,01$, $P < 0,0001$) quando comparados aos demais grupos, e na decídua basal
1511 ($P < 0,01$) quando comparado ao grupo hipotireoideo (Figura 3B). Quanto à expressão do
1512 IGF1r, foi observada marcação principalmente nuclear em todas as regiões, mas também
1513 citoplasmática na região do labirinto (Figura 3C). Na quantificação da imunomarcção, não
1514 houve diferença entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 3D). Já a imunomarcção de INSR β foi
1515 citoplasmática e homogênea, principalmente no triângulo metrial, zona juncional e zona de
1516 labirinto (Figura 3E). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos
1517 ao longo das camadas da interface materno-fetal ($P > 0,05$; Figura 3F).

1518 Em relação a expressão gênica placentária, também não foram observadas diferenças
1519 significativas para *Igf1*, *Igf1r*, *Insr* e *Irs1* entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 3G).

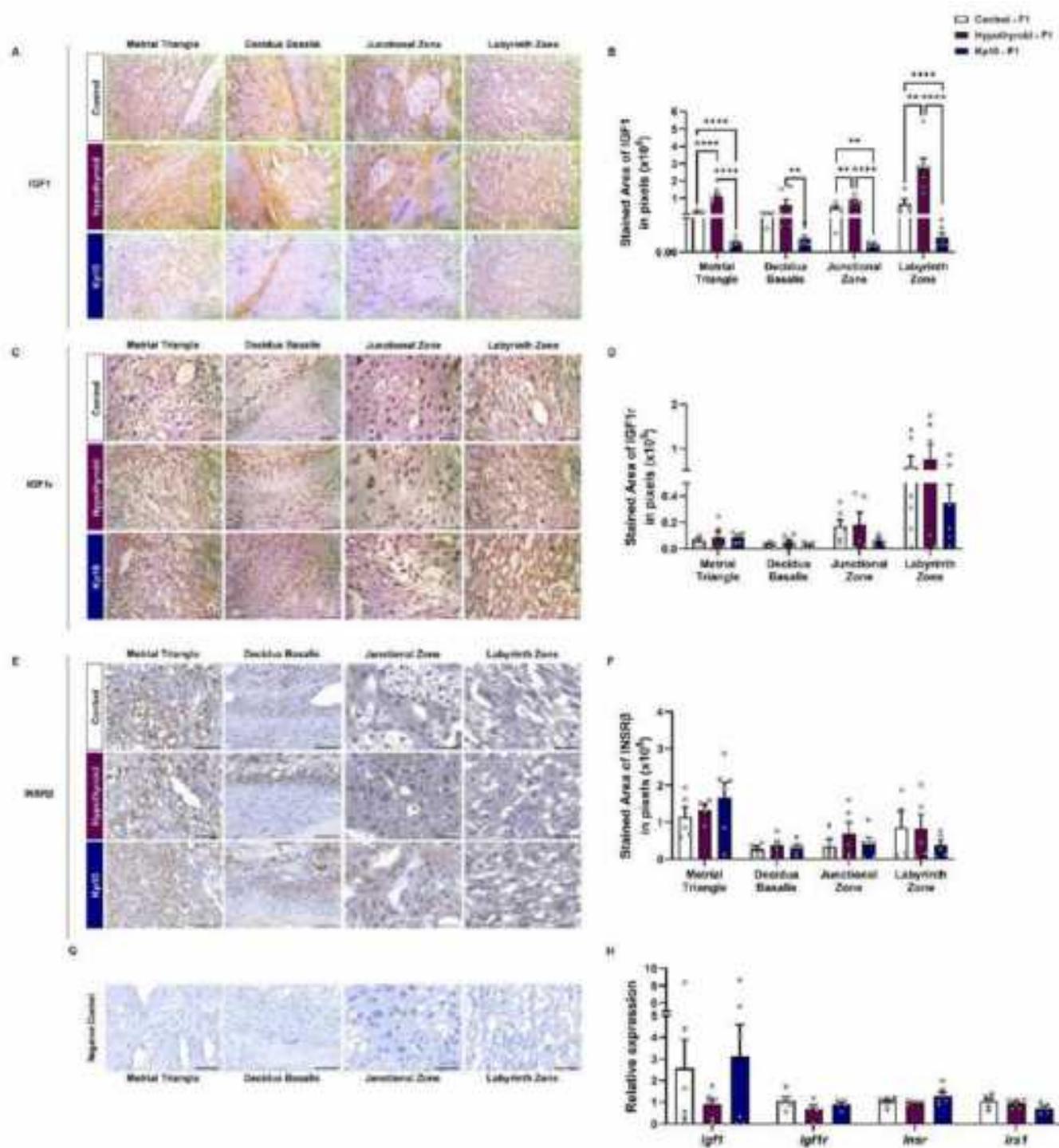


Figura 4 Avaliação da via IGF1/IGF1r e da sinalização insulínica na interface materno-fetal de ratos controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1) A) Fotomicrografias da imunomarcagem de IGF1 aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de IGF1 aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcagem de IGF1r aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de IGF1r aos 18 DG. E) Fotomicrografias da imunomarcagem de INSR β aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). F) Área de imunomarcagem em pixels da expressão de INSR β aos 18 DG. G) Expressão gênica de *Igf1*, *Igflr*, *Insr* e *Irs1* aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc SNK; Média \pm SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. DG = dias de gestação. Barra = 50 μ m.

1521 *O tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas previne o aumento da expressão de*
1522 *mTOR na interface materno-fetal da geração F1*

1523 Visto que a sinalização de mTOR está associada à regulação metabólica glicêmica e é
1524 considerada como sensor nutricional na placenta (HOFFMAN et al., 2021; ROOS; POWELL;
1525 JANSSON, 2009), avaliou-se a expressão de AKT, p-mTOR/*mTor* e *Raptor* na interface
1526 materno-fetal dos animais. A imunomarcagem de AKT foi citoplasmática, discreta a moderada,
1527 principalmente no triângulo metrial, nas células gigantes e na zona de labirinto (Figura 5A),
1528 mas não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 5B). Em relação ao p-
1529 mTOR, a marcação foi nuclear e/ou citoplasmática, heterogênea, em toda a interface materno-
1530 fetal (Figura 5C), e semelhante a expressão do rPRL, também apresentou aumento da
1531 imunomarcagem na decídua basal ($P < 0,001$), zona juncional ($P < 0,01$) e zona de labirinto (P
1532 $< 0,05$) nos animais do grupo hipotireoideo-F1 comparado ao controle. O grupo Kp10-F1, por
1533 outro lado, apresentou redução da imunomarcagem comparado ao grupo hipotireoideo-F1 (P
1534 $< 0,05$, $P < 0,001$; Figura 5D), igualando ao controle-F1 ($P > 0,05$).

1535 Na avaliação dos transcritos gênicos placentários, não foram observadas diferenças na
1536 expressão de *mTor* e *Raptor* entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 3E).

1537

1538

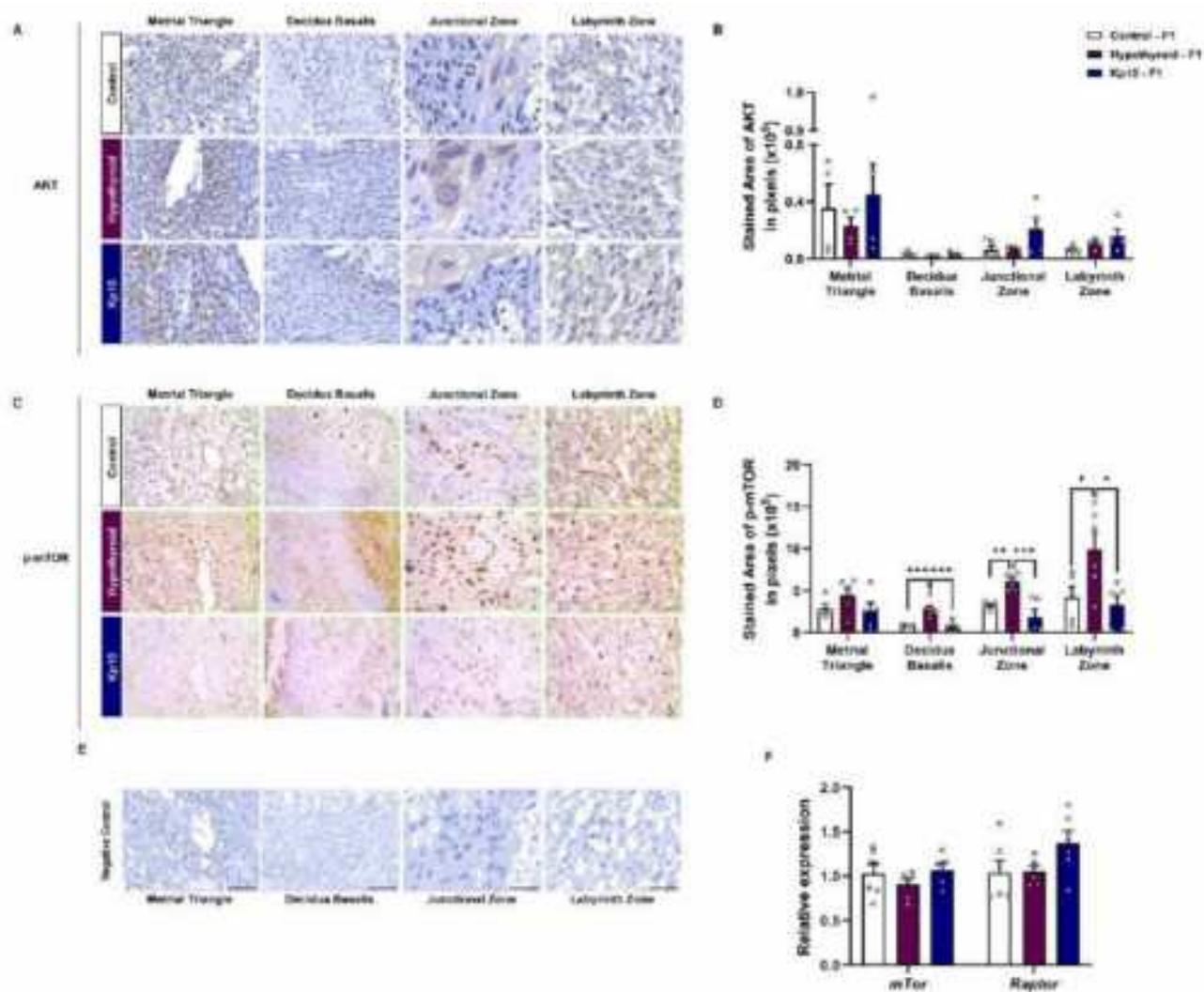


Figura 5 Avaliação da sinalização AKT/mTOR na interface materno-fetal de ratas controle-F1, hipotireoideas-F1 e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10-F1 (Kp10-F1) A) Fotomicrografias da imunomarcção de AKT aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). B) Área de imunomarcção em pixels da expressão de AKT aos 18 DG. C) Fotomicrografias da imunomarcção de p-mTOR aos 18 DG (Estreptavidina-biotina-peroxidase; Hematoxilina de Harris; Aumento de 400x). D) Área de imunomarcção em pixels da expressão de p-mTOR aos 18 DG. E) Expressão gênica de *mTor* e *Raptor* aos 18 DG. (Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. DG = dias de gestação. Barra = 50µm.

1539

1540

1541

1542

1543

1544

1545

1546 6.4. DISCUSSÃO

1547

1548 É bem estabelecido que a disfunção placentária resultante do hipotireoidismo materno
1549 está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de disfunções cardiometabólicas e
1550 reprodutivas na prole adulta (ESHKOLI et al., 2019; KOBAYASHI et al., 2014;
1551 LUCACCIONI et al., 2021; MIAO et al., 2021; PANAHANDEH et al., 2022), e que o
1552 tratamento com kisspeptina-10 melhora a morfologia, estado redox e sinalização energética da
1553 placenta de ratas hipotireoideas (SANTOS et al., 2022c, 2023a; dados não publicados).
1554 Contudo, não havia informações sobre os efeitos intergeracionais do hipotireoidismo e da
1555 administração de kisspeptina-10 durante a gestação na homeostase energética materna e
1556 placentária. O presente estudo, portanto, demonstrou que o tratamento materno com Kp10 em
1557 ratas hipotireoideas melhora o desenvolvimento feto-placentário das mães F1, além de prevenir
1558 a desregulação placentária de mTOR, IGF1 e rPRL causada pelo hipotireoidismo materno nas
1559 placentas F2.

1560 Apesar do hipotireoidismo materno não ter alterado o ganho de massa corporal e a
1561 concentração plasmática de T4 nas mães F1, o tratamento com Kp10 durante a gestação da
1562 geração F0 aumentou a concentração plasmática de T4 livre em fêmeas F1 gestantes e acelerou
1563 o ganho de massa corporal ao longo da gestação, além de prevenir a redução da glicemia
1564 aleatória observada nas fêmeas gestantes descendentes de ratas hipotireoideas. Esses achados
1565 sugerem que o tratamento materno com Kp10 na geração F0 pode influenciar o metabolismo
1566 gestacional da geração F1. Estudos anteriores já mostraram que, em ratas F0, o tratamento com
1567 Kp10 atenuou a redução do ganho de peso induzida pelo hipotireoidismo (SANTOS et al.,
1568 2022c). Além disso, o aumento da concentração plasmática de T4 livre no grupo Kp10-F1 está
1569 associado ao estado gestacional, uma vez que foi observada a recuperação do estado eutireoideo
1570 na prole jovem das ratas hipotireoideas, conforme também relatado em estudos anteriores na
1571 prole adulta (BAGHERIPUOR et al., 2015; FARAHANI et al., 2010; JEDDI et al., 2020;
1572 KARBALAEI et al., 2014; LIU et al., 2019). No entanto, os mecanismos envolvidos no ganho
1573 de massa corporal materna mais rápido na prole F1 gestante causada pela Kp10, como também
1574 a maior concentração plasmática de T4 livre, precisam ser elucidados.

1575 Além disso, a geração F1 de ratas hipotireoideas demonstrou que, embora não haja
1576 alterações na tolerância à glicose na prole gestante, os níveis glicêmicos são reduzidos. Em
1577 contraste, ratas F0 com hipotireoidismo materno apresentam aumento da glicemia e intolerância
1578 à glicose (KENT; ATLURI; CUFFE, 2022; dados não publicados), como também é observado

1579 na prole jovem (30 PN) (dados não publicados). Entretanto, quando adultas (60 PN), a prole F1
1580 não apresenta mais alterações na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina (dados não
1581 publicados), como observado na prole F1 gestante do presente estudo.

1582 Uma vez que a tolerância à glicose, a sensibilidade à insulina e os níveis de insulina
1583 plasmática não apresentaram alteração, uma possível explicação para a redução da glicemia
1584 aleatória aos 18DG seria um aumento na captação periférica da glicose circulante nesses
1585 animais, principalmente por mecanismos independentes de insulina (EBELING; KOISTINEN;
1586 KOIVISTO, 1998; KRISHNAPURAM et al., 2013). No entanto, mais análises são necessárias
1587 para comprovar essa hipótese. O tratamento materno com Kp10 na geração F0, por sua vez,
1588 impediu a redução glicêmica. Estudo anterior demonstrou melhora na homeostase glicêmica da
1589 prole fêmea de ratas hipotireoideas tratadas com Kp10 (dados não publicados), sugerindo que
1590 essa melhora é mantida durante a gestação.

1591 O hipotireoidismo materno também reduziu a espessura da zona juncional em placentas
1592 F2, alteração oposta à observada em placentas F1, nas quais ocorre aumento da espessura dessa
1593 zona devido ao acúmulo de células de glicogênio (SILVA et al., 2012; SILVA; OCARINO;
1594 SERAKIDES, 2014). Dessa forma, a redução na espessura pode também estar associada a
1595 alterações na composição dessa camada, o que torna necessária uma análise morfológica mais
1596 detalhada. Em contrapartida, o tratamento materno com Kp10 na geração F0 impediu a redução
1597 da espessura da zona juncional nas placentas F2, sendo que Santos et al. (2022c; dados não
1598 publicados) demonstraram que a administração de Kp10 em ratas hipotireoideas é capaz de
1599 restabelecer a espessura da zona juncional em placentas F1. Em conjunto, esses estudos e o
1600 presente trabalho sugerem que o tratamento materno com Kp10 na geração F0 hipotireoidea
1601 pode proteger a morfologia placentária ao longo das gerações.

1602 Embora tenha sido mantida a mesma massa corporal fetal em todos os grupos, foi
1603 observado um deslocamento à direita da distribuição da massa corporal fetal da geração F2
1604 proveniente das ratas hipotireoideas, com conseqüente aumento da porcentagem de fetos
1605 grandes para a idade gestacional (LGA). Essa alteração é oposta à observada em gestações de
1606 ratas hipotireoideas com crescimento fetal restrito, que apresenta deslocamento à esquerda da
1607 curva de distribuição da massa fetal (SANTOS et al., 2022c). Diferente do presente estudo,
1608 trabalhos prévios em ratas nascidas com crescimento restrito induzido por inflamação
1609 exacerbada (USHIDA et al., 2022), insuficiência uteroplacentária (BRIFFA et al., 2017;
1610 GALLO et al., 2012), ou em mulheres que apresentavam baixo peso ao nascimento
1611 (SEPÚLVEDA-MARTÍNEZ et al., 2019), quando gestantes, transmitem a restrição do

1612 crescimento para a próxima geração. No entanto, em ratas com diabetes gestacional induzido
1613 por estreptozotocina, uma endocrinopatia associada ao hipotireoidismo materno (BIONDI;
1614 KAHALY; ROBERTSON, 2019; GONG; LIU; LIU, 2016; PINTO et al., 2023; WANG et al.,
1615 2021b), observa-se também aumento da massa fetal na geração F2 (CAPOBIANCO et al., 2018;
1616 LINENBERG et al., 2021), enquanto que, em ratas F1, é comumente observada a redução da
1617 massa fetal (KISS et al., 2009; SINZATO et al., 2019), sugerindo que tanto na diabetes
1618 gestacional quanto no hipotireoidismo materno em modelo experimental há uma mudança nos
1619 efeitos dessas endocrinopatias na massa fetal ao longo das gerações.

1620 O tratamento materno com Kp10 nas ratas hipotireoideas F0 reduziu o deslocamento à
1621 direita da curva de massa fetal da geração F2. Na geração F1 de ratas hipotireoideas, a Kp10
1622 também foi capaz de manter a curva de distribuição de massa similar ao controle (SANTOS et
1623 al., 2022c), além de melhorar a expressão de fatores de crescimento e a sinalização energética
1624 placentária (SANTOS *et al.*, 2023, 2022; dados não publicados). Dessa forma, em conjunto,
1625 esses estudos e o presente trabalho sugerem que a kisspeptina é capaz de melhorar o ambiente
1626 intrauterino e manter o desenvolvimento fetal adequado ao longo das gerações.

1627 A prole F1 gestante das ratas hipotireoideas apresentaram aumento da expressão de
1628 rPRL na interface materno-fetal. O ligante do rPRL, a prolactina, pertence à família dos
1629 hormônios lactogênicos, que incluem diversas prolactinas e os lactogênicos placentários
1630 (SOARES, 2004), de forma que o aumento desse receptor pode sugerir maior sinalização
1631 placentária desses hormônios. Na placenta, embora ainda existam lacunas quanto à ação desses
1632 hormônios durante a gestação e na programação metabólica, já foi demonstrado que eles são
1633 importantes para a homeostase glicêmica, adaptação sistêmica materna durante a gestação,
1634 angiogênese, invasão e migração trofoblástica, e regulação do sistema imunológico (NAPSO et
1635 al., 2018; NEWBERN; FREEMARK, 2011; RANA; JAIN; CHOUBEY, 2022; SOARES;
1636 KONNO; ALAM, 2007; STERN et al., 2021). Apesar de a gestação ser uma condição de
1637 aumento da prolactina, o aumento exacerbado da sua sinalização está associado a complicações
1638 gestacionais, como pré-eclâmpsia (ALAWAD; AL-OMARY, 2019; LENKE et al., 2020) e
1639 diabetes gestacional (OLMOS-ORTIZ et al., 2021; PERIMENIS et al., 2014).

1640 Também foi observado aumento da marcação de IGF1 na interface materno-fetal da
1641 prole F1 gestante das ratas hipotireoideas. Na placenta, o IGF1 é considerado um importante
1642 regulador da capacidade de transporte de nutrientes placentários (SFERRUZZI-PERRI et al.,
1643 2006, 2017), além de ser um regulador fundamental do crescimento fetal (BAUMANN et al.,
1644 2014). A concentração plasmática fetal de IGF1 está positivamente relacionada ao crescimento

1645 fetal (BORGES et al., 2019). Contudo, o aumento da expressão de IGF1 está associado ao
1646 fenótipo observado de macrosomia em mulheres com diabetes gestacional (SHANG; WEN,
1647 2018), o que também está relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de obesidade
1648 na vida pós-natal desses fetos (HUFNAGEL et al., 2022).

1649 A interação do IGF1 com seu receptor é um dos primeiros mensageiros da via
1650 IGF1/AKT/mTOR, uma via importante para a regulação do metabolismo celular
1651 (ARDESTANI; MAEDLER, 2018; SAXTON; SABATINI, 2017) Assim como o IGF1,
1652 também foi observado aumento da expressão de p-mTOR na interface materno-fetal da prole
1653 F1 gestante das ratas hipotireoideas. Assim, o aumento de fetos LGA observado no presente
1654 estudo pode estar associado ao aumento da expressão placentária de rPRL, IGF1 e mTOR, uma
1655 vez que estudos sugerem que esses componentes funcionam como sensores nutricionais
1656 placentários, estando seu aumento ou diminuição diretamente relacionados a alterações na
1657 massa fetal (ROOS; POWELL; JANSSON, 2009). Esse achado está de acordo com um estudo
1658 anterior, que também demonstrou aumento da expressão de p-mTOR na zona de labirinto em
1659 placentas de machos F2 provenientes de ratas que sofreram restrição de crescimento
1660 intrauterino (MANGWIRO et al., 2019). Além disso, o que foi observado no presente estudo é
1661 o oposto do que foi encontrado nas placentas F1 de ratas hipotireoideas, nas quais houve
1662 redução da expressão de mTOR placentário (dados não publicados), associado ao crescimento
1663 fetal restrito e deslocamento da curva de distribuição de massa fetal para a esquerda (SANTOS
1664 et al., 2022c).

1665 Interessantemente, o tratamento com Kp10 em ratas F0 gestantes hipotireoideas foi
1666 capaz de impedir o aumento da rPRL, IGF1 e mTOR na interface materno-fetal da prole F1,
1667 além de aumentar a expressão placentária de *Plii*. Essas alterações podem estar associadas ao
1668 reestabelecimento da espessura da zona juncional e da distribuição da curva de massa corporal
1669 fetal observada na geração F2. Essa melhora do desenvolvimento feto-placentário da prole F1
1670 causado pela Kp10 pode ser resultante da melhora da programação metabólica da prole F1, pois
1671 demonstramos recentemente a modulação positiva da Kp10 na programação glicêmica da prole
1672 de ratas com hipotireoidismo materno (dados não publicados).

1673 Dessa forma, os achados deste estudo demonstraram que o aumento de fetos F2 LGA
1674 causado pelo hipotireoidismo em ratas F0 está associado a alterações na morfologia placentária
1675 e desregulação da expressão de mTOR, IGF1 e rPRL na interface materno-fetal da prole F1. O
1676 tratamento materno com Kp10 em ratas F0, por outro lado, foi capaz de impedir essas
1677 alterações, melhorando a distribuição de peso fetal. Este é o primeiro estudo a descrever as

1678 alterações no desenvolvimento feto-placentário de ratas F1 descendentes de ratas com
1679 hipotireoidismo materno, além de destacar o potencial intergeracional do tratamento com Kp10
1680 em ratas F0 em proteger contra essas alterações.

1681 7. **CAPÍTULO 3:**

1682

1683

1684

1685

1686

1687

1688

1689 **TRATAMENTO COM KISSPEPTINA EM RATAS COM HIPOTIREOIDISMO**
1690 **MATerno MELHORA A TOLERÂNCIA A GLICOSE NA PROLE FÊMEA F1 E**
1691 **APÓS DESAFIO COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

1692

1693

1694

TRATAMENTO COM KISSPEPTINA EM RATAS COM HIPOTIREOIDISMO

1695

MATERNO MELHORA A TOLERÂNCIA A GLICOSE NA PROLE FÊMEA F1 E

1696

APÓS DESAFIO COM DIETA HIPERLIPÍDICA

1697

1698

RESUMO

1699

1700

Uma vez que o hipotireoidismo materno (HM) compromete a homeostase glicêmica da prole e a administração materna de kisspeptina-10 (Kp10) melhora o metabolismo energético placentário em ratas com HM, avaliamos se o tratamento materno com Kp10 atenua a disfunção glicêmica na prole causada pelo HM e a disfunção metabólica induzida por dieta hiperlipídica (HFD). Na prole macho, o HM desregulou a sensibilidade à insulina antes do desafio, e acelerou o ganho de massa corporal, acentuando o acúmulo de tecido adiposo inguinal e a concentração plasmática de colesterol total e HDL após exposição a dieta HFD. Já em fêmeas, o HM causou intolerância à glicose e resistência à insulina antes da dieta HFD, além de acentuar a disfunção glicêmica, reduzir a expressão hepática de *Insr*, e aumentar o acúmulo de gordura retroperitoneal e marrom após exposição a dieta HFD. O tratamento materno com Kp10, por outro lado, melhorou a tolerância glicêmica em ambos os sexos antes do segundo desafio, enquanto nas fêmeas também atenuou a intolerância à glicose decorrente da dieta HFD. Esses resultados demonstram que o hipotireoidismo materno compromete a homeostase glicêmica da prole de maneira sexo-específica, e que o tratamento materno com Kp10 melhora a programação glicêmica da prole, principalmente em fêmeas, inclusive após exposição a dieta hiperlipídica. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, o potencial da administração materna de Kp10 como ferramenta promissora para a prevenção ou atenuação de disfunção metabólica na prole em idade adulta.

1718

1719

1720

Palavras-chaves: DOHaD; Insulina; Kiss1; Metabolismo; Obesidade; Tireoide.

1721

1722 7.1. INTRODUÇÃO

1723 O hipotireoidismo materno (HM) é um importante distúrbio cardiometabólico que
1724 compromete a gestação e o ambiente intrauterino, podendo acarretar diversos problemas à
1725 saúde da mãe e do feto (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; SULLIVAN, 2019), como
1726 também aos descendentes na vida adulta (ESHKOLI et al., 2019; GE et al., 2020; MIAO et al.,
1727 2021). Mulheres gestantes com hipotireoidismo apresentam abortos recorrentes e complicações
1728 durante o período pré-natal, como pré-eclâmpsia, descolamento de placenta, parto prematuro e
1729 restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (SHRESTHA; TRIPATHI; DONGOL, 2019;
1730 SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018; WANG et al., 2021b). Em ratas, a RCIU causada
1731 pelo hipotireoidismo materno também foi associada a disfunção placentária e alteração da
1732 homeostase glicêmica materna (FOTAKIS et al., 2022; SILVA; OCARINO; SERAKIDES,
1733 2018),

1734 Os hormônios tireoidianos são um dos principais moduladores do metabolismo, pois
1735 regulam a homeostase da glicose, e o desenvolvimento, maturação e função das células
1736 pancreáticas (BRENTA, 2011; MULLUR; LIU; BRENT, 2014). Estudos prévios já
1737 demonstraram que o hipotireoidismo durante a gestação em mulheres e animais experimentais
1738 aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes gestacional (BIONDI; KAHALY;
1739 ROBERTSON, 2019; GONG; LIU; LIU, 2016; PINTO et al., 2023; WANG et al., 2021b),
1740 sendo elas as endocrinopatias mais prevalentes durante esse período (PINTO et al., 2023).
1741 Ambas as desordens, no entanto, causam efeitos semelhantes no controle glicêmico, como falha
1742 na absorção e metabolização da glicose, e redução da sensibilidade à insulina (BIONDI;
1743 KAHALY; ROBERTSON, 2019). Em ratas gestantes, a deficiência dos hormônios tireoidianos
1744 altera a tolerância a glicose na prole, como também a sensibilidade e secreção de insulina fetal,
1745 persistindo essa alteração metabólica ao longo da vida adulta (HARRIS et al., 2017; JEDDI et
1746 al., 2020; KEMKEM et al., 2020; TAPIA-MARTÍNEZ et al., 2019). Por isso, a programação
1747 metabólica fetal e a sua saúde pós-natal dependem de um metabolismo materno e placentário
1748 adequados, conforme a Hipótese das Origens do Desenvolvimento de Saúde e Doença
1749 (*Developmental Origins of Health and Disease hypothesis* – DOHaD). Fatores ambientais
1750 presentes durante a vida intrauterina influenciam o risco de doenças crônicas durante a fase
1751 adulta (BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; GLUCKMAN; HANSON, 2004), sendo
1752 que Doenças não transmissíveis (DNTs) são responsáveis por 74% das mortes no mundo
1753 (WHO, 2022).

1754 No feto ou na prole no início da vida, as respostas adaptativas ao estado de saúde
1755 materno podem ser observadas de maneira discreta por alterações duradouras no metabolismo
1756 hormonal e na sensibilidade dos tecidos aos hormônios e nutrientes, inclusive na homeostase
1757 glicêmica (GLUCKMAN et al., 2008). No entanto, essas alterações geralmente são observadas
1758 fenotipicamente somente na vida tardia da prole ou após exposição a um “segundo desafio”,
1759 como é feito em modelos experimentais expostos a dieta hiperlipídica (AKHAPHONG et al.,
1760 2021; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016; GLUCKMAN et al., 2008; SINZATO et
1761 al., 2022). Pensando nisso, ferramentas terapêuticas que visam modular a função placentária e
1762 o metabolismo materno em doenças metabólicas gestacionais parecem ser excelentes
1763 estratégias de prevenção de DNTs em gerações futuras (GLUCKMAN; HANSON, 2004;
1764 KRAMER et al., 2023). Recente estudo do nosso grupo demonstrou que o tratamento materno
1765 com kisspeptina-10 foi capaz de melhorar o desenvolvimento feto-placentário de ratas com
1766 hipotireoidismo, sugerindo ser uma potencial ferramenta terapêutica em doenças gestacionais
1767 (SANTOS et al., 2022c).

1768 A kisspeptina, peptídeo bem conhecido pelos seus papéis no controle do eixo
1769 hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) (XIE et al., 2022), tem sido reconhecido também como
1770 um hormônio placentário que regula o metabolismo materno (BOWE et al., 2019; MUSA;
1771 MATJILA; LEVITT, 2021; SZLAPINSKI; HILL, 2020; SZYDEŁKO-GORZKOWICZ et al.,
1772 2022) e um biomarcador sérico de sucesso gestacional (HU et al., 2019; SZYDEŁKO-
1773 GORZKOWICZ et al., 2022; TSOUTSOUKI et al., 2022). Tanto a diabetes gestacional como
1774 o hipotireoidismo materno estão associados a alterações nos níveis plasmáticos e/ou
1775 placentários de kisspeptina (ĆETKOVIĆ et al., 2012; KAPUSTIN et al., 2020; MUSA;
1776 MATJILA; LEVITT, 2021; SANTOS et al., 2022b). Além disso, estudos também já
1777 demonstraram que a kisspeptina é capaz de modular a liberação de insulina e estimular a
1778 adaptação das células β pancreáticas durante a gestação (BOWE et al., 2019; IZZI-
1779 ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019). No entanto, não há estudos avaliando o efeito do
1780 tratamento materno com kisspeptina na prevenção de alterações metabólicas glicêmicas na
1781 prole em idade adulta.

1782 No presente estudo avaliamos se a administração de kisspeptina-10 em ratas com
1783 hipotireoidismo materno influencia a homeostase glicêmica da prole e atenua a disfunção
1784 metabólica causada por dieta hiperlipídica. Os achados demonstraram que o tratamento com
1785 kisspeptina-10 foi capaz de modular de forma sexo-específica a homeostase glicêmica da prole
1786 e melhorar a tolerância a glicose em fêmeas F1, inclusive após exposição a dieta hiperlipídica.
1787

1788 7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

1789 *Animais*

1790 Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Laboratório de Criação, Manutenção e
1791 Experimentação Animal (LaBIO) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais
1792 foram mantidos em caixas plásticas (5-6 animais/caixa) com temperatura (22 ± 2 °C) e
1793 luminosidade (12:00 h claro / 12:00 h escuro) controladas. Os animais tiveram livre acesso a
1794 água e ração comercial (NUVILAB® Cr-1, Nuvital, Colombo, PR, Brazil). Todos os
1795 procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
1796 UESC (CEUA N° 026/22).

1797

1798 *Indução do hipotireoidismo e tratamento com Kisspeptina-10 (Kp10)*

1799 Ratas Wistar (204 ± 14 g) foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n =
1800 30) e hipotireoideo (n = 55). O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária, por
1801 sonda orogástrica, de 6-propyl-2-thiouracil (PTU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído
1802 em água destilada (4 mg/Kg/dia), enquanto os animais controles receberam somente água
1803 destilada. O tratamento com PTU ou água iniciou cinco dias antes do acasalamento e terminou
1804 no dia do parto. Ratas em proestro foram alocadas com machos saudáveis *overnight*, e a
1805 presença de espermatozoides em citologia vaginal na manhã seguinte confirmou a cópula e foi
1806 determinado como 0 dia gestacional (DG). Após confirmação da cópula, os animais
1807 hipotireoideos foram divididos nos grupos hipotireoideo (n = 28) e hipotireoideo tratado com
1808 kisspeptina-10 (Kp10; n = 27). O tratamento com Kp10 (8 µg/Kg/dia/IP) iniciou no 8° DG e
1809 terminou no dia do parto, enquanto os outros animais receberam água estéril como placebo
1810 (SANTOS et al., 2022c). Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados no 18° DG com
1811 guilhotina para coleta de sangue, dosagem de T4 livre e confirmação da indução da hipofunção
1812 tireoidiana.

1813

1814 *Delineamento experimental*

1815 Após o parto, as ninhadas foram padronizadas em 7-8 filhotes por mãe. O dia de
1816 nascimento da prole foi determinado como o 1° dia pós-natal (PN) e o desmame foi realizado
1817 com 21 dias. Neste momento, formou-se os grupos controle-F1 (N= 136), hipotireoideo-F1 (N
1818 = 98) e hipotireoideo tratado com Kp10-F1 (N= 93). Vinte animais de cada grupo foram
1819 eutanasiados no 3° (5 machos e 5 fêmeas) e 21° (5 machos e 5 fêmeas) PN para avaliação de T4
1820 livre plasmático. Desde o nascimento, os filhotes foram pesados a cada semana, durante 60

1821 dias, para acompanhamento da curva de crescimento. No 30° e 60° PN, 12 filhotes de cada
1822 grupo (6 machos e 6 fêmeas) foram escolhidos aleatoriamente para realização dos testes de
1823 tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a insulina (TTIPI). O
1824 sangue da veia caudal foi coletado para posterior dosagem de insulina plasmática.

1825 Após os 60 PN, machos (250 ± 28 g; N = 28) e fêmeas (173 ± 14 g; N = 34) de cada
1826 grupo foram submetidos à dieta hiperlipídica (HFD, 60% kcal; RH19572, Rhoster Indústria e
1827 Comércio Ltda, São Paulo, BR) durante 6 semanas. A prole do grupo controle foi dividida em
1828 dois grupos: controle sem dieta e controle com dieta HFD. Foram realizados os TTIPG e TTIPI
1829 com 4 e 6 semanas de dieta, além da avaliação do ganho de massa corporal e ingestão de
1830 alimento. Os animais foram eutanasiados após 6 semanas de dieta.

1831 Os animais foram pesados semanalmente após o início da dieta para avaliação do
1832 percentual de ganho de massa corporal em relação a massa corporal inicial. Além disso, a
1833 quantificação da ingestão de comida foi feita pela diferença diária entre a massa da ração
1834 colocada e a ração restante no dia seguinte, por caixa de animais. A partir da massa de ração
1835 ingerida por caixa, foi calculada a ingestão diária por animal em quilocalorias, de acordo com
1836 a tabela nutricional da ração HFD (1 g = 5,28 kcal).

1837

1838 *Testes de tolerância intraperitoneal a glicose (TTIPG) e tolerância intraperitoneal a insulina*
1839 *(TTIPI).*

1840 No TTIPG, após jejum por 6 horas, a glicemia basal dos animais foi avaliada entre
1841 11:00-12:00 seguida da administração de glicose (2g/Kg/animal), via intraperitoneal, e
1842 posterior avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. Em seguida, os animais foram alimentados
1843 *ad libitum* por 1 hora e mantidos em jejum por 1 hora para o TTIPI. A glicemia basal foi
1844 novamente avaliada e, logo após, aplicada insulina (0,75 UI/Kg/animal), via intraperitoneal,
1845 com posterior avaliação da glicemia aos 30, 60 e 120 min. A glicemia foi dosada com uma gota
1846 de sangue da ponta da cauda utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Performa, Roche,
1847 USA). O TTIPI foi realizado no mesmo dia e com jejum de 1 hora para evitar maior estresse ao
1848 animal e por não apresentar diferenças na glicemia basal e na curva glicêmica em relação ao
1849 teste realizado em dia diferente (intervalo de 1 semana) e com jejum de 6 horas (DA SILVA et
1850 al., 2025; submetido).

1851 A área sob a curva (AUC) do TTIPG e do TTIPI foram calculados seguindo a seguinte
1852 equação (ALTMAN, 1990):

1853

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{n-1} (\text{tempo}_{i+1} - \text{tempo}_i)(\text{glicemia}_i + \text{glicemia}_{i+1})$$

1855

1856 *Coleta de sangue e Dosagem de insulina e T4 livre*

1857 As amostras de sangue foram coletadas da prole aos 30 e 60 PN (15:00-18:00) pela veia
 1858 da cauda, e ao 21 PN e após 6 semanas de dieta HFD (8:00-12:00) pela artéria cervical após
 1859 eutanásia com guilhotina, em tubos heparinizados. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm
 1860 por 20 min e o plasma obtido foi armazenado a -20°C para dosagem de insulina ou T4 livre. O
 1861 ensaio para insulina foi realizado através do Rat/Mouse Insulin Elisa Kit (EZRMI-13K; EMD
 1862 Millipore Corporation, Missouri, USA) conforme instruções do fabricante, enquanto a dosagem
 1863 de T4 livre foi realizada com o Kit de ELISA IMMULITE (Siemens Medical Solutions
 1864 Diagnostics, Malvern, PA, USA) conforme instruções do fabricante.

1865

1866 *Necropsia e coleta de material*

1867 Ao final das 6 semanas com dieta HFD, os animais foram eutanasiados entre 9:00-12:00.
 1868 Foram coletados e pesados o tecido adiposo branco (retroperitoneal e inguinal de ambos os
 1869 lados) e marrom, o fígado e o pâncreas. Foi obtida uma média da massa de cada tecido adiposo
 1870 branco. As massas de todos os tecidos foram avaliadas relativas à massa corporal do animal.
 1871 Fragmentos dos tecidos coletados foram fixados em paraformaldeído 4% a 4°C por 24 horas e
 1872 processados pela técnica de inclusão em parafina para análise histológica. Os tecidos foram
 1873 desidratados em solução seriada de álcool 70% até 100%, com posterior diafanização em xilol
 1874 e impregnação e inclusão em parafina. Cortes de 4 µm dos tecidos foram obtidos pela
 1875 microtomia em lâminas histológicas para avaliação histomorfométrica. Fragmentos do tecido
 1876 adiposo inguinal e marrom e do fígado também foram coletados em Trizol separadamente,
 1877 seguido de congelamento em nitrogênio líquido e estocagem a -80°C para análises de qRT-PCR
 1878 de mediadores da sinalização insulínica periférica.

1879

1880 *Análise Bioquímica*

1881 Após 6 semanas de exposição a dieta HFD foram feitas as dosagens plasmáticas de
 1882 aspartato amino transferase (AST) (K048; Quibasa Química Básica Ltda.; Minas Gerais, BR),
 1883 alanina amino transferase (ALT) (K049; Quibasa Química Básica Ltda.; Minas Gerais, BR),
 1884 triglicerídeos (K117; Quibasa Química Básica Ltda.; Minas Gerais, BR), Colesterol total
 1885 (100/280-500; VIDA Biotecnologia LTDA.; Minas Gerais, BR) e lipoproteína de alta densidade
 1886 (*High-Density Lipoprotein* – HDL) (K071; Quibasa Química Básica Ltda.; Minas Gerais, BR)

1887 com kits comerciais e de acordo as instruções de uso do fabricante, utilizado o analisador
1888 bioquímico semiautomático BIO-2000. A lipoproteína de baixa densidade (*Low Density*
1889 *Lipoprotein* – LDL) foi calculado conforme a fórmula de Friedewald:

$$1890 \quad LDL = \text{Colesterol total} - \left(HDL (mg/dL) + \frac{\text{Triglicerídeos (mg/dL)}}{5} \right)$$

1891

1892 *Histomorfometria do tecido adiposo branco*

1893 A análise histomorfométrica do tecido adiposo branco foi realizada em cortes
1894 histológicos de 8 µm, e corados com Hematoxilina e Eosina. A avaliação quantitativa foi
1895 realizada em 20 regiões aleatórias, com auxílio do software Adiposoft. Foi quantificado o
1896 tamanho e distribuição dos adipócitos em pequenos (<100 µm), médios (100-300 µm) e
1897 grandes (> 300 µm) (GALARRAGA et al., 2012).

1898

1899 *qRT-PCR*

1900 A extração do RNA total do fígado foi realizada com Trizol (Invitrogen, Life
1901 Technologies, Carlsbad, CA, USA) conforme as instruções do fabricante. A concentração e a
1902 qualidade do RNA foi avaliada com Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo scientific).
1903 Para a síntese do cDNA foi utilizado 1 µg de RNA usando o kit comercial GoTaq® qPCR and
1904 RT-qPCR Systems (A6010, PROMEGA). Os transcritos dos genes alvo foram quantificados
1905 pela qPCR utilizando 1,5 µL de cDNA, 100 nM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente
1906 GoTaq® qPCR Master Mix, 2X em um volume final de 20 µL de reação, no equipamento da
1907 Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System. Como controle negativo utilizou o mix de
1908 amplificação de DNA, em que a amostra de cDNA foi substituída por água. As condições para
1909 as amplificações foram: ativação enzimática a 95 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95
1910 °C por 15 s e anelamento/extensão a 60 °C por 60 s. A linearidade e a eficiência da amplificação
1911 da qPCR foram avaliadas através de curvas padrões dos transcritos geradas utilizando diluições
1912 seriadas do cDNA. Os iniciadores para *Insr*, *Isr-1* e *mTor* foram selecionados de estudos
1913 anteriores com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica
1914 foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que os resultados obtidos para cada grupo foram
1915 comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de *Gapdh Rattus*
1916 *norvegicus* (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2014).

1917 Tabela 1 - Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores	Referência
<i>Insr</i>	F: GGCCCGATGCTGAGAACA R: CGTCATTCCAAAGTCTCCGA	(HAGHIR et al., 2013)
<i>Irs-1</i>	F: GGCACCATCTCAACAATC R: GTTTCCCACCCACCATAC	(ABDELMAGEED et al., 2021)
<i>mTor</i>	F: CCCTTTACACCATGCATAGCT R: GAGGGTTACCATTGTGGAAGT R: ACCATAGGCTGGAGTTGCAC	(MAZUMDER; PATIAL; SINGH, 2019)
<i>Gapdh</i>	F: ACAGCCGCATCTTCTTGTGC R: GCCTCACCCCATTTGATGTT	(SANTOS et al., 2023b)

1918

1919 *Análise estatística*

1920 Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e
1921 D'Agostino-Pearson omnibus) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) dos erros e os dados
1922 paramétricos foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido de teste Student-
1923 Newman-Keuls (SNK). Para os dados que não atenderem aos pressupostos, mesmo após
1924 transformação logarítmica, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido
1925 de teste de Dunn's (GraphPad Prism 10.1.2). Os dados paramétricos estão representados por
1926 Média \pm Erro padrão da média (SEM), enquanto os não-paramétricos foram representados por
1927 plot de violino, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P <$
1928 0,05.

1929

1930 **7.3. RESULTADOS**

1931

1932 *O tratamento materno com Kp10 não afeta o aumento do período gestacional e a diminuição*
1933 *da massa corporal e dos níveis de T4 livre nos neonatos causados pelo hipotireoidismo materno*
1934 *em ratas*

1935 Durante o estudo, foi observado que os animais hipotireoideos, confirmado pelos
1936 menores níveis de T4 livre ($P < 0,0001$; Figura 1A), apresentaram redução da taxa de parição
1937 (Figura 1B) e aumento da duração da gestação ($P < 0,05$; Figura 1C), embora não tenha sido
1938 observada alteração no tamanho da ninhada ($P > 0,05$; Figura 1D). O tratamento com Kp10
1939 não alterou esses parâmetros nas ratas hipotireoideas ($P > 0,05$). O grupo controle teve 95% de
1940 sucesso gestacional, enquanto os grupos hipotireoideos e Kp10 tiveram aproximadamente 77%

1941 (Figura 1B). Também foi observada uma distribuição de fêmeas e machos, respectivamente, de
 1942 57% e 43% no grupo controle, 47% e 53% no grupo hipotireoideo, e 58% e 42% no grupo Kp10
 1943 (Figura 1E).

1944 O HM reduziu os valores de T4 livre plasmático nos neonatos (3 PN) ($P < 0,05$), ao
 1945 mesmo tempo que o tratamento com Kp10 não foi capaz de revertê-lo ($P < 0,05$). Contudo, nos
 1946 animais jovens com 21 PN, o HM manteve a redução da concentração plasmática de T4 livre
 1947 nos machos ($P < 0,01$), enquanto o tratamento com Kp10 não foi capaz de reverter ($P > 0,05$).
 1948 Não foram observadas alterações significativas na dosagem de T4 livre na prole fêmea aos 21
 1949 PN ($P > 0,05$; Figura 1F)

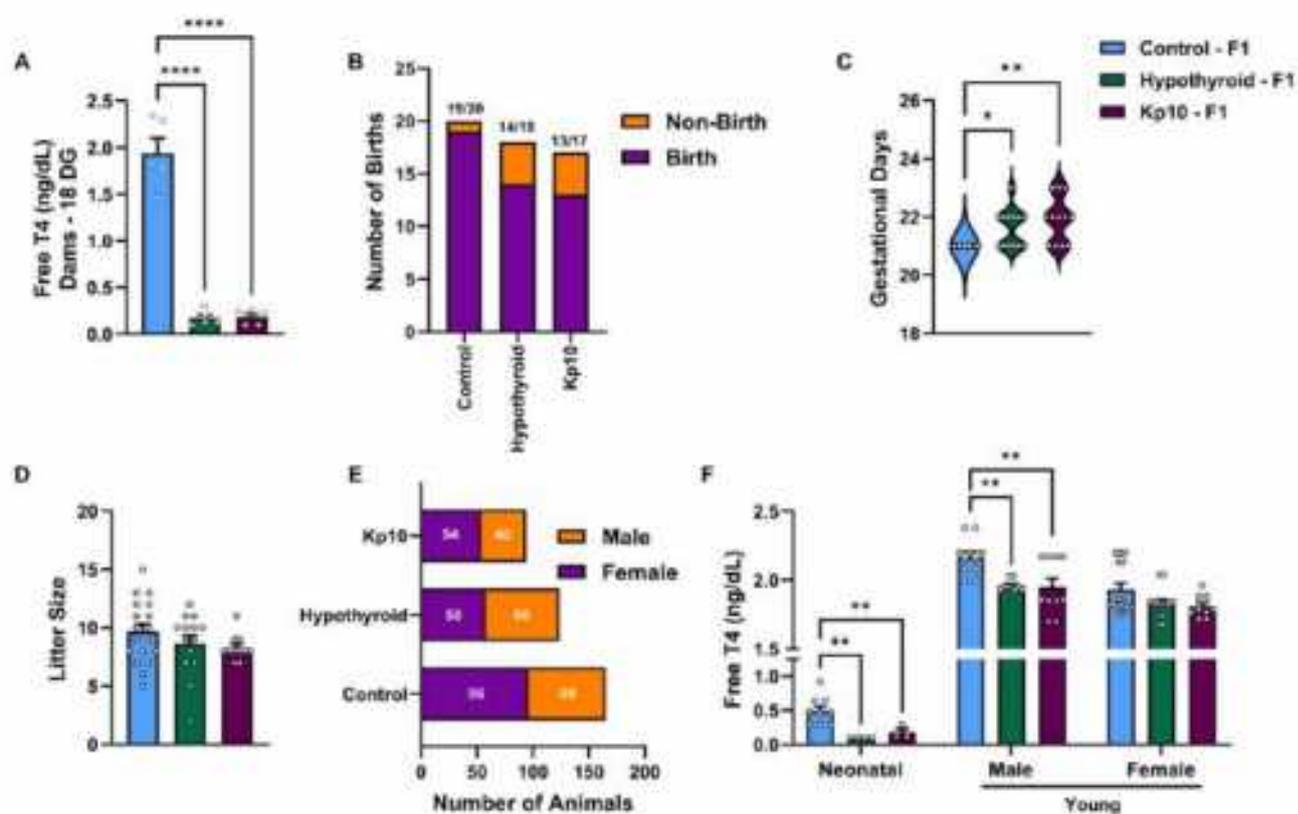


Figura 1 Dados reprodutivos e de T4 livre de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Níveis plasmáticos de T4 livre. B) Número de parições. C) Comprimento do período gestacional. D) Tamanho de ninhada. E) Proporção de filhotes machos e fêmeas por grupo. F) Níveis plasmáticos de T4 livre na prole aos 3 (neonatal) e 21 (jovem) PN. (A, D, F: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM; C: Kruskal-Wallis post hoc Dunn's; Plot de violino;). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

1950

1951 *O tratamento materno com Kp10 melhora a tolerância a glicose na prole macho de ratas*
 1952 *hipotireoideas, mas não afeta a resistência à insulina alterada*

1953 Considerando que o HM compromete a homeostase energética da prole (DAVID;
 1954 ASIWE; FASANMADE, 2021) e que a kisspeptina regula a homeostase glicêmica (IZZI-
 1955 ENGBEAYA; HILL; BOWE, 2019), avaliamos o efeito da administração materna de Kp10 na

1956 homeostase glicêmica da prole de ratas hipotireoideas. No acompanhamento do
1957 desenvolvimento pós-natal da prole macho, foi observada uma variação na curva de
1958 crescimento entre os grupos ($P = 0,0308$, Figura 2A). O HM reduziu a massa corporal da prole
1959 nas semanas 0 e 1 ($P < 0,001$, $P < 0,05$), sendo que a partir da 3^o semana não foram observadas
1960 diferenças entre os grupos ($P > 0,05$). Entretanto, o tratamento materno com Kp10 acelerou a
1961 recuperação do ganho de massa corporal da prole macho, uma vez que na 2^o semana apresentou
1962 maior massa corporal comparado ao grupo hipotireoideo F1 ($P < 0,05$), igualando ao controle
1963 F1 ($P > 0,05$; Figura 2A).

1964 Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas dosagens de glicemia
1965 em jejum e aleatória aos 30 e 60 PN ($P > 0,05$; Figura 2B-C), houve uma tendência de redução
1966 da glicemia aleatória na prole macho das mães hipotireoideas quando comparada ao controle
1967 F1 ($P = 0,0737$; Figura 2C). Aos 30 PN, não foram observadas diferenças significativas no
1968 TTIPG e na AUC correspondente ($P > 0,05$, figura 2D-E). Por outro lado, no TTIPI, o HM
1969 causou um aumento da glicemia com 60 e 120 minutos ($P < 0,01$; $P < 0,0001$), refletindo em
1970 maior AUC ($P < 0,01$) em comparação com o controle F1. O tratamento materno com Kp10,
1971 entretanto, não foi capaz de prevenir essas alterações ($P < 0,05$; $P < 0,0001$, Figura 2H-I).

1972 Aos 60 PN, no TTIPG, observou-se menor glicemia na prole macho do grupo Kp10 F1
1973 aos 30 min comparado ao grupo hipotireoideo F1 ($P < 0,05$, Figura 2F), bem como menor AUC
1974 em comparação ao controle F1 ($P < 0,05$; Figura 2G). Por outro lado, no TTIPI, a prole macho
1975 das ratas com HM exibiram menor glicemia aos 60 min em relação ao controle F1 ($P < 0,05$),
1976 ao passo que a administração de Kp10 preveniu essa redução ($P < 0,05$), igualando ao controle
1977 F1 ($P > 0,05$, Figura 2J). A análise da AUC também demonstrou redução da glicemia no grupo
1978 hipotireoideo F1 comparado ao controle F1 ($P < 0,05$), enquanto uma tendência de aumento foi
1979 observada após o tratamento materno com Kp10 ($P = 0,0674$, Figura 2J-K). Em conjunto, esses
1980 resultados demonstram que o tratamento materno com Kp10 permitiu melhorar a tolerância a
1981 glicose da prole macho aos 60 PN, mas não afetou a desregulação da resistência à insulina
1982 causada pelo HM.

1983

1993 < 0,05). No entanto, aumento da massa corporal no grupo Kp10 F1 foi observado na 2ª semana
1994 comparado ao grupo hipotireoideo F1 ($P < 0,05$), igualando ao controle F1 ($P > 0,05$; Figura
1995 3A).

1996 Na avaliação da glicemia de jejum, apesar de não haver diferenças significativas entre
1997 os grupos aos 30 e 60 PN ($P > 0,05$), houve uma tendência de redução na prole fêmea do grupo
1998 Kp10 em relação ao grupo hipotireoideo F1 ($P = 0,0688$, Figura 3B). Contudo, nas dosagens
1999 de glicemia aleatória, observamos que, aos 30 PN, fêmeas do grupo hipotireoideo F1 exibiram
2000 maior glicemia em comparação ao controle ($P < 0,05$), enquanto não foram observadas
2001 diferenças significativas aos 60 PN ($P > 0,05$; Figura 3C).

2002 Seguindo para o TTIPG aos 30 PN, as fêmeas do grupo Kp10 F1 apresentaram menor
2003 glicemia nos tempos de 30 e 120 minutos em relação à prole de ratas hipotireoideas ($P < 0,01$;
2004 Figura 3C), mas nenhum efeito significativo foi observado na glicemia entre as fêmeas
2005 controles F1 e hipotireoideas F1 nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos ($P > 0,05$). No entanto, na
2006 avaliação da AUC, maior glicemia foi observada no grupo hipotireoideo F1 em comparação ao
2007 controle F1 ($P < 0,05$), enquanto o tratamento materno com Kp10 reduziu essa glicemia ($P <$
2008 $0,01$), inclusive em relação ao controle F1 ($P < 0,05$; Figura 3E).

2009 No TTUPI aos 30 PN, o HM aumentou a glicemia da prole fêmea nos tempos de 30 e 60
2010 minutos em comparação ao controle F1 ($P < 0,05$; $P < 0,001$; Figura 3H), enquanto o tratamento
2011 com Kp10 não influenciou esse aumento da glicemia ($P < 0,05$; $P < 0,001$; Figura 3H). Na
2012 análise da AUC, ambos os grupos hipotireoideo F1 e Kp10 F1 apresentaram maior glicemia em
2013 relação ao controle F1 ($P < 0,01$; $P < 0,001$, Figura 3I).

2014 Aos 60 PN, por outro lado, não foram observadas diferenças significativas no TTIPG e
2015 TTUPI, assim como em suas respectivas AUCs ($P > 0,05$, Figura 3F-G e J-K). Esses achados
2016 evidenciam, portanto, que o tratamento materno com Kp10 melhorou a tolerância à glicose aos
2017 30 PN na prole fêmea de ratas com HM, apresentando inclusive níveis glicêmicos menores aos
2018 do controle F1. No entanto, a administração de Kp10 não influenciou a resistência à insulina na
2019 prole fêmea causada pelo HM.

2020

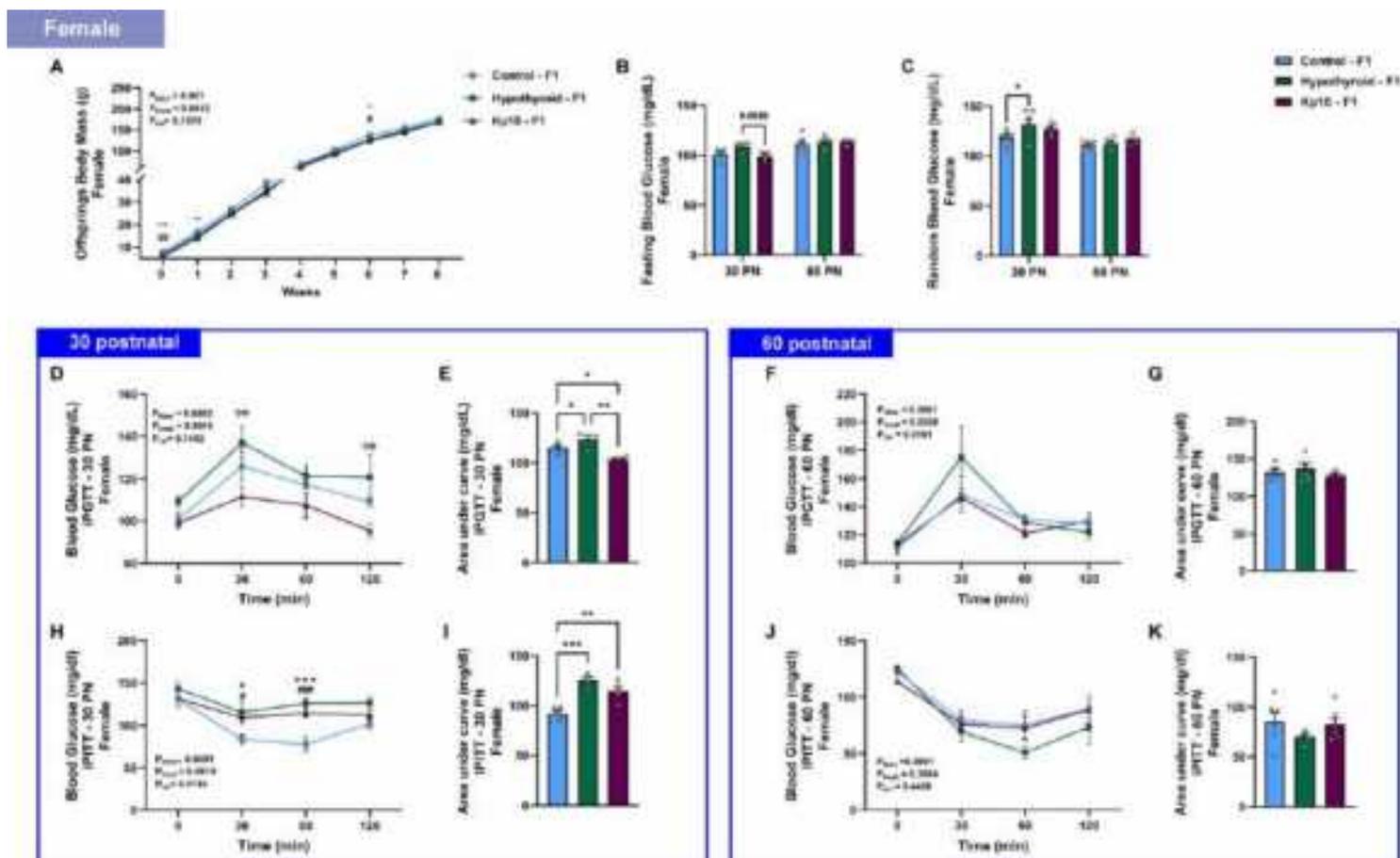


Figura 3 Desenvolvimento pós-natal e homeostase glicêmica da prole fêmea de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Curva de crescimento da prole. B) Glicemia em jejum aos 30 e 60 PN. C) Glicemia aleatória aos 30 e 60 PN. D) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 30 PN. E) Área sob a curva do TTIPG aos 30 PN. F) Curva glicêmica do teste de tolerância à glicose aos 60 PN. G) Área sob a curva do TTIPG aos 60 PN. H) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 30 PN. I) Área sob a curva do TTUPI aos 30 PN. J) Curva glicêmica do teste de tolerância à insulina aos 60 PN. K) Área sob a curva do TTUPI aos 60 PN. (A, D, F, H, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM; B, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, exceto do A, D, F, H e J, que * $P < 0,05$ controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; ** $P < 0,01$ controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; *** $P < 0,001$ controle-F1 vs. hipotireoideo-F1; # $P < 0,05$ controle-F1 vs. Kp10-F1; ## $P < 0,01$ controle-F1 vs. Kp10-F1; ### $P < 0,001$ controle-F1 vs. Kp10-F1; $\Phi\Phi$ $P < 0,01$ hipotireoideo-F1 vs. Kp10-F1. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; PN = dias pós-natal.

2021

2022 *O hipotireoidismo materno acelera o ganho de massa corporal da prole macho exposta a dieta*
 2023 *hiperlipídica.*

2024 Estudos demonstraram que uma programação metabólica fetal alterada decorrente de
 2025 doenças gestacionais é fenotipicamente observada ou exacerbada após um “segundo desafio”
 2026 durante a vida adulta, sendo em modelos experimentais muitas vezes representado pela dieta
 2027 hiperlipídica (AKHAPHONG et al., 2021; BURTON; FOWDEN; THORNBURG, 2016;
 2028 GLUCKMAN et al., 2008; SINZATO et al., 2022). Assim, a prole de ratas hipotireoideas foi
 2029 exposta a uma dieta hiperlipídica para avaliar seus efeitos no ganho de massa corporal e
 2030 homeostase glicêmica e para avaliar se a Kp10 possui algum efeito protetor.

2031 A prole macho das ratas com HM apresentou menor massa corporal comparado ao
2032 controle F1 antes do início da exposição à dieta hiperlipídica ($P < 0,05$), enquanto os machos
2033 provenientes do grupo Kp10 F1 tiveram um aumento da massa corporal ($P < 0,01$), igualando-
2034 se ao controle F1 ($P > 0,05$; Figura 3A). Ao avaliar a curva de ganho de massa corporal durante
2035 o período de exposição a dieta hiperlipídica, foi observado um aumento no grupo controle F1
2036 +HFD a partir de 15 dias após início da dieta em comparação ao controle F1 ($P < 0,05$, $P <$
2037 $0,01$, $P < 0,001$, $P < 0,0001$). No entanto, os animais do grupo Hipotireoideo F1 + HFD tiveram
2038 aumento do ganho de massa corporal a partir de 10 dias de dieta HFD em relação ao grupo
2039 controle F1 ($P < 0,01$), como também foi observado no grupo Kp10 F1+HFD comparado ao
2040 controle F1 ($P < 0,01$; Figura 3B). Dessa forma, todas as proles expostas à dieta hiperlipídica
2041 tiveram aumento do ganho de massa corporal em relação ao controle F1 ($P < 0,01$; Figura 3B).
2042 Também foi observado aumento da ingestão calórica em todos os grupos expostos a dieta HFD
2043 comparado ao controle F1 ($P < 0,01$, $P < 0,001$; Figura 3C).

2044 Na avaliação da homeostase glicêmica com 4 semanas de dieta, todos os grupos
2045 expostos a HFD apresentaram aumento da glicemia basal quando comparados ao controle F1
2046 ($P < 0,05$, $P < 0,01$), exceto o grupo Hipotireoideo F1 + HFD que apresentou uma tendência de
2047 aumento ($P = 0,0567$). No entanto, com 6 semanas de dieta não foram observadas diferenças
2048 significativas entre os grupos ($P > 0,05$; Figura 3D).

2049 No TTIPG, após 4 semanas de dieta hiperlipídica, houve aumento da glicemia ao 30
2050 min em todos os grupos expostos a HFD em relação ao controle F1 ($P < 0,001$; Figura 3E),
2051 embora não tenha sido observado diferenças significativas na análise da AUC ($P > 0,05$; Figura
2052 3F). Ademais, no TTIPI, também foi observado aumento da glicemia das proles expostas a HFD
2053 aos 60 minutos em relação ao controle F1 ($P < 0,01$, $P < 0,0001$), sendo que os machos do
2054 grupo hipotireoideo F1+HFD mantiveram maior glicemia aos 120 minutos em comparação ao
2055 controle F1 ($P < 0,05$, Figura 3I). A AUC do TTIPI demonstrou que os grupos controle-F1 +
2056 HFD, hipotireoideo F1 + HFD e Kp10 F1 + HFD apresentaram maior glicemia em comparação
2057 ao controle F1 ($P < 0,05$; Figura 3J).

2058 Após 6 semanas de dieta hiperlipídica, houve aumento acentuado da glicemia no TTIPG
2059 aos 30 e 60 minutos os grupos controle F1 + HFD, hipotireoideo F1 + HFD e Kp10 F1 + HFD
2060 comparado ao controle F1 ($P < 0,0001$, Figura 3G), como também foi observado na avaliação
2061 da AUC ($P < 0,0001$, Figura 3H). No entanto, no TTIPI, apenas o grupo controle F1+HFD
2062 apresentou aumento da glicemia aos 60 minutos ($P < 0,05$, Figura 3K), enquanto não tiveram
2063 diferenças significativas entre os outros grupos ($P > 0,05$). Também não foram observadas
2064 diferenças significativas na análise da AUC ($P > 0,05$, Figura 3L).

2065

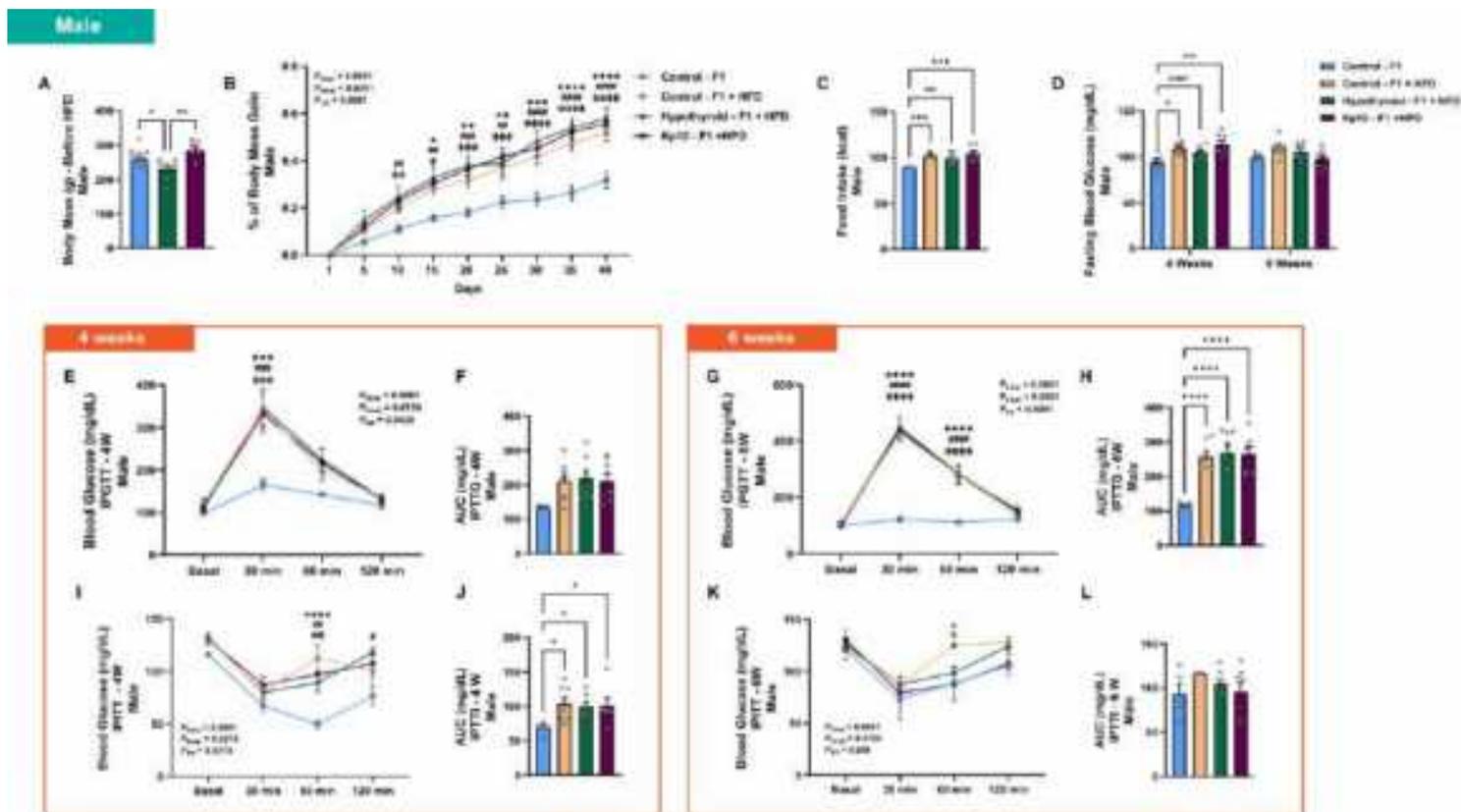


Figura 4 Ganho de massa corporal e homeostase glicêmica da prole macho exposta a dieta hiperlipídica de ratos controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Massa corporal antes da exposição à dieta hiperlipídica. B) Curva de ganho de massa corporal da prole durante exposição a dieta hiperlipídica. C) Média de ingestão de comida. D) Glicemia em jejum após 4 e 6 semanas de HFD. E) Curva glicêmica do IPGTT após 4 semanas de HFD. F) Área sob a curva do TTIPG após 4 semanas de HFD. G) Curva glicêmica do IPGTT após 6 semanas de HFD. H) Área sob a curva do TTIPG após 6 semanas de HFD. I) Curva glicêmica do IPITT após 4 semanas de HFD. J) Área sob a curva do TTIPI após 4 semanas de HFD. K) Curva glicêmica do IPITT após 6 semanas de HFD. L) Área sob a curva do TTIPI após 6 semanas de HFD. (A, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; B, D, F, H, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$, exceto do C, E, G, I e K, que * $P < 0,05$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ** $P < 0,01$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; *** $P < 0,001$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; **** $P < 0,0001$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; # $P < 0,01$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ### $P < 0,001$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; #### $P < 0,0001$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ϕ $P < 0,05$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\phi\phi$ $P < 0,01$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\phi\phi\phi$ $P < 0,001$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\phi\phi\phi\phi$ $P < 0,0001$ controle vs. Kp10-F1+HFD; δ $P < 0,05$ controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; HFD = dieta hiperlipídica; W= semanas.

2066

2067 *O tratamento materno com Kp10 retarda e reduz a intolerância à glicose decorrente da*
 2068 *exposição a dieta hiperlipídica em prole fêmea de ratos hipotireoideas*

2069 Diferente da prole macho, as fêmeas F1 não apresentaram diferenças significativas nas
 2070 massas corporais antes do período de exposição a dieta hiperlipídica ($P > 0,05$; Figura 5A).
 2071 Durante a exposição à HFD, o grupo controle F1+HFD apresentou maior ganho de massa
 2072 corporal a partir de 15 dias do início da dieta quando comparado ao controle F1 ($P < 0,05$, $P <$

2073 0,01, $P < 0,0001$). As fêmeas do grupo hipotireoideo F1+HFD, por outro lado, apresentaram
2074 maior ganho de massa corporal somente a partir do dia 20, quando comparadas ao controle F1
2075 ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Elas também apresentaram menor ganho de massa corporal no 30° dia,
2076 quando comparadas ao controle F1+HFD ($P < 0,05$), e no 35° dia quando comparada aos demais
2077 grupos expostos a HFD ($P < 0,05$). Por outro lado, o grupo Kp10 F1+HFD teve curva de ganho
2078 de massa semelhante ao controle F1+HFD ($P > 0,05$). Todos os grupos expostos a HFD
2079 apresentaram aumento significativo da ingestão calórica comparado ao controle F1 ($P <$
2080 $0,0001$; Figura 5C)

2081 Ao avaliar a glicemia em jejum após 4 semanas de dieta, todos os grupos expostos a
2082 HFD apresentaram aumento da glicemia quando comparados ao controle F1 ($P < 0,05$, $P <$
2083 $0,01$, $P < 0,001$), enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após
2084 6 semanas de dieta ($P > 0,05$, Figura 5D). Na avaliação do TTIPG após 4 semanas de dieta,
2085 houve aumento da glicemia aos 30 minutos em todos os grupos expostos a HFD em comparação
2086 ao controle F1 ($P < 0,05$, $P < 0,0001$). Entretanto, a prole fêmea do grupo hipotireoideo
2087 F1+HFD apresentou valores glicêmicos significativamente maiores que do grupo controle
2088 F1+HFD ($P < 0,05$), enquanto as fêmeas do grupo Kp10-F1+HFD não apresentaram esse
2089 aumento, possuindo um pico semelhante ao do grupo controle F1+HFD ($P > 0,05$, Figura 5E).
2090 Com isso, na análise da AUC, o grupo hipotireoideo F1+HFD apresentou um aumento da
2091 glicemia quando comparado ao controle F1 ($P < 0,01$, Figura 5F), enquanto não foram
2092 observadas diferenças significativas entre os demais grupos. No TTUPI, após 4 semanas de dieta,
2093 foi observado um aumento da glicemia nos tempos de 30, 60 e 120 minutos dos grupos expostos
2094 a dieta hiperlipídica quando comparados ao controle F1 ($P < 0,001$, $P < 0,0001$, Figura 5I),
2095 resultando também em aumento da AUC dos mesmos grupos em relação ao controle F1 ($P <$
2096 $0,0001$, Figura 5J).

2097 Seguindo para 6 semanas de exposição à dieta hiperlipídica, as fêmeas controle F1+HFD
2098 e hipotireoideo F1+HFD apresentaram aumento da glicemia nos tempos de 30 e 60 minutos
2099 comparado ao controle F1 ($P < 0,0001$, Figura 5G), como também foi observado na análise da
2100 AUC ($P < 0,0001$, Figura 5H). Por outro lado, apesar de apresentar valores glicêmicos e AUC
2101 maiores que do controle F1, o tratamento materno com Kp10 em ratas hipotireoideas atenuou
2102 o aumento da glicemia na prole fêmea exposta a HFD, pois teve menores valores glicêmicos e
2103 AUC quando comparado com os grupos controle F1+HFD e hipotireoideo F1+HFD ($P < 0,05$,
2104 $P < 0,01$, $P < 0,0001$). Já no TTUPI, o grupo hipotireoideo F1+HFD apresentou menor glicemia
2105 no tempo de 60 minutos em relação aos demais grupos ($P < 0,001$, $P < 0,0001$), enquanto o
2106 tratamento com Kp10 foi capaz de bloquear essa redução, se igualando aos grupos controle F1

2107 e controle F1+HFD ($P > 0,05$). Aos 120 minutos, os grupos controle F1+HFD e Kp10 F1+HFD
 2108 tiveram maior glicemia quando comparado ao controle F1 ($P < 0,05$, $P < 0,01$). Além disso, o
 2109 grupo Kp10 F1+HFD também apresentou maior glicemia que o grupo hipotireoideo F1+HFD
 2110 ($P < 0,05$, Figura 5K). Na avaliação da AUC do TTIPI, o grupo hipotireoideo F1+HFD teve
 2111 menor glicemia comparado ao controle F1+HFD ($P < 0,05$), enquanto o tratamento materno
 2112 com Kp10 em ratas hipotireoideas bloqueou essa redução ($P < 0,01$, Figura 5L).

2113 Em conjunto, os resultados demonstraram que o HM retardou o ganho de massa corporal
 2114 da prole fêmea após exposição a dieta hiperlipídica, ao mesmo tempo que acelerou a ocorrência
 2115 da intolerância à glicose e aumentou a sensibilidade a insulina após 6 semanas de dieta.
 2116 Contudo, interessante, o tratamento materno com Kp10 retardou e atenuou a intolerância
 2117 à glicose na prole fêmea decorrente de dieta hiperlipídica.

2118

2119

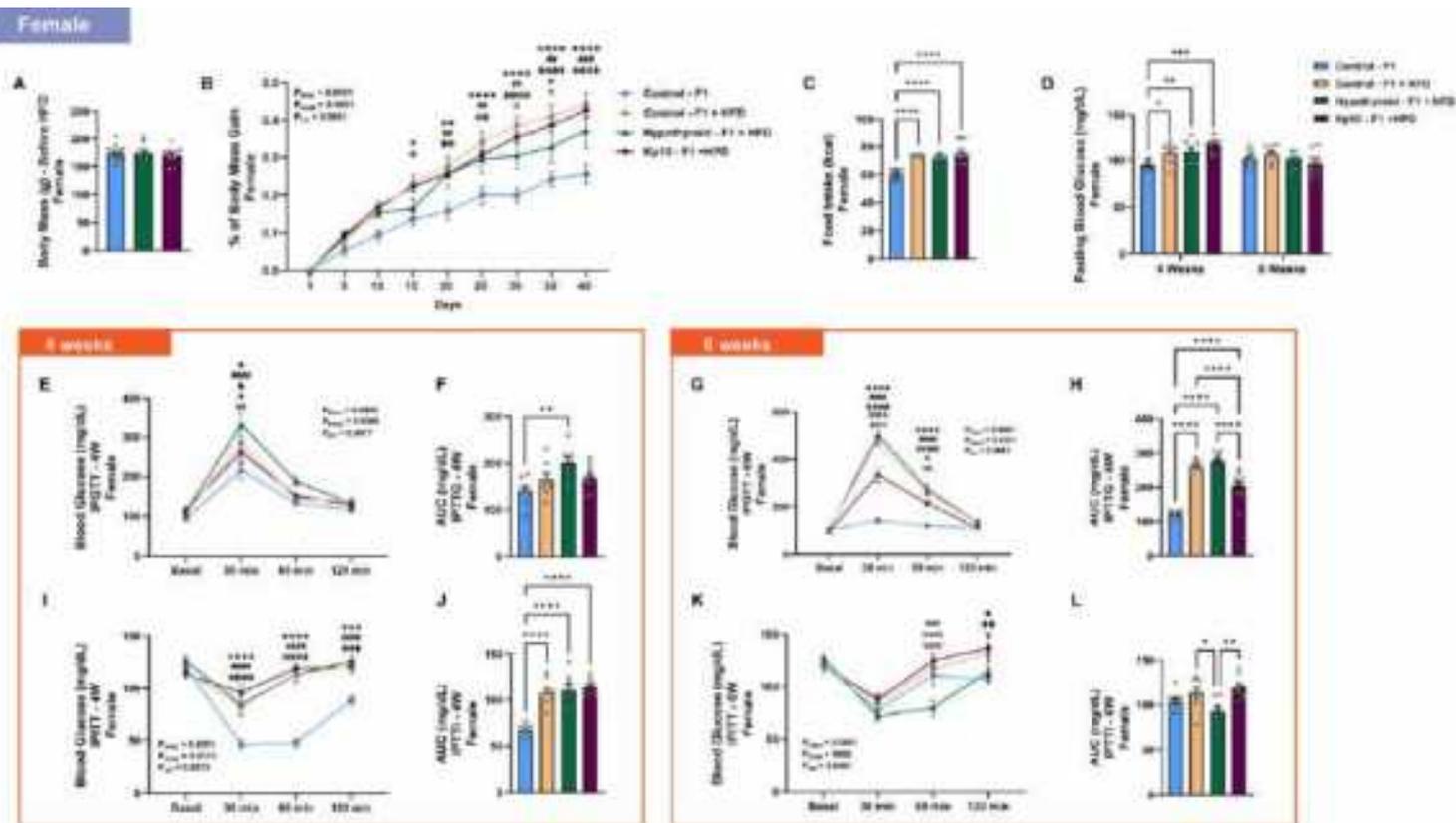


Figura 5 Ganho de massa corporal e homeostase glicêmica da prole fêmea exposta a dieta hiperlipídica de ratas controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Massa corporal antes da exposição à dieta hiperlipídica. B) Curva de ganho de massa corporal da prole durante exposição a dieta hiperlipídica. C) Média de ingestão de comida. D) Glicemia em jejum após 4 e 6 semanas de HFD. E) Curva glicêmica do IPGTT após 4 semanas de HFD. F) Área sob a curva do TTIPG após 4 semanas de HFD. G) Curva glicêmica do IPGTT após 6 semanas de HFD. H) Área sob a curva do TTIPG após 6 semanas de HFD. I) Curva glicêmica do IPITT após 4 semanas de HFD. J) Área sob a curva do TTUPI após 4 semanas de HFD. K) Curva glicêmica do IPITT após 6 semanas de HFD. L) Área sob a curva do TTUPI após 6 semanas de HFD. (A, C, E, G, I, K: Anova de uma via post hoc SNK; B, D, F, H, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, exceto do C, E, G, I e K, que * $P < 0,05$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ** $P < 0,01$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; *** $P < 0,001$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; **** $P < 0,0001$ controle-F1 vs. controle-F1+HFD; ### $P < 0,01$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; #### $P < 0,001$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; ##### $P < 0,0001$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; Φ $P < 0,05$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\Phi\Phi$ $P < 0,01$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\Phi\Phi\Phi$ $P < 0,001$ controle vs. Kp10-F1+HFD; $\Phi\Phi\Phi\Phi$ $P < 0,0001$ controle vs. Kp10-F1+HFD; α $P < 0,05$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; $\alpha\alpha\alpha$ $P < 0,001$ controle-F1+HFD vs. hipotireoideo-F1+HFD; δ $P < 0,05$ controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; $\delta\delta\delta$ $P < 0,0001$ controle-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; γ $P < 0,05$ hipotireoideo-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; $\gamma\gamma$ $P < 0,01$ hipotireoideo-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD; $\gamma\gamma\gamma$ $P < 0,0001$ hipotireoideo-F1+HFD vs. Kp10-F1+HFD. IPGTT = Teste de tolerância intraperitoneal à glicose; IPITT = Teste de tolerância intraperitoneal à insulina; HFD = dieta hiperlipídica; W = semanas.

2120

2121 *O tratamento materno com Kp10 não é capaz de bloquear o aumento exacerbado de tecido*
 2122 *adiposo inguinal causado pelo hipotireoidismo materno na prole macho exposta a dieta*
 2123 *hiperlipídica*

2124 Na prole macho foi observado aumento da concentração plasmática de colesterol total
 2125 no grupo hipotireoideo F1+HFD quando comparado ao grupo controle F1 ($P < 0,05$), além do
 2126 aumento da sua fração HDL quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$, $P < 0,01$; Figura
 2127 6A). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de
 2128 triglicerídeos, LDL, AST e ALT entre os grupos da prole macho ($P > 0,05$; Figura 6A-B).

2129 Em relação ao fígado dos animais, a dieta hiperlipídica reduziu a massa hepática ($P <$
 2130 $0,01$, Figura 6C) em todos os grupos comparados ao controle F1. No entanto, não foram
 2131 observadas diferenças significativas na expressão hepática de mRNA de *Insr*, *Irs1* e *mTor* entre
 2132 os grupos ($P > 0,05$; Figura 6D).

2133 Na avaliação dos tecidos adiposos branco e marrom, foi observado também um aumento
 2134 homogêneo da massa dos tecidos retroperitoneal e marrom nos machos expostos à HFD
 2135 comparado ao controle F1 ($P < 0,01$, $P < 0,001$, Figura 6 E e G). No entanto, o HM exacerbou
 2136 o aumento da massa de tecido inguinal comparado aos animais dos grupos controle F1 e
 2137 controle F1+HFD ($P < 0,01$, $P < 0,001$, $P < 0,0001$), enquanto o tratamento materno com Kp10
 2138 não influenciou essa alteração (Figura 6F). Ao avaliar a morfologia dos adipócitos do tecido
 2139 inguinal, não foram observadas diferenças significativas na média da área dos adipócitos nem
 2140 na porcentagem de adipócitos pequenos e grandes ($P > 0,05$; Figura 6I-J). Contudo, o grupo
 2141 controle F1+ HFD e Kp10 F1+ HFD apresentaram menor proporção de adipócitos médios
 2142 comparado ao grupo controle F1 ($P < 0,05$, $P < 0,01$; Figura 6J).

2143

2144

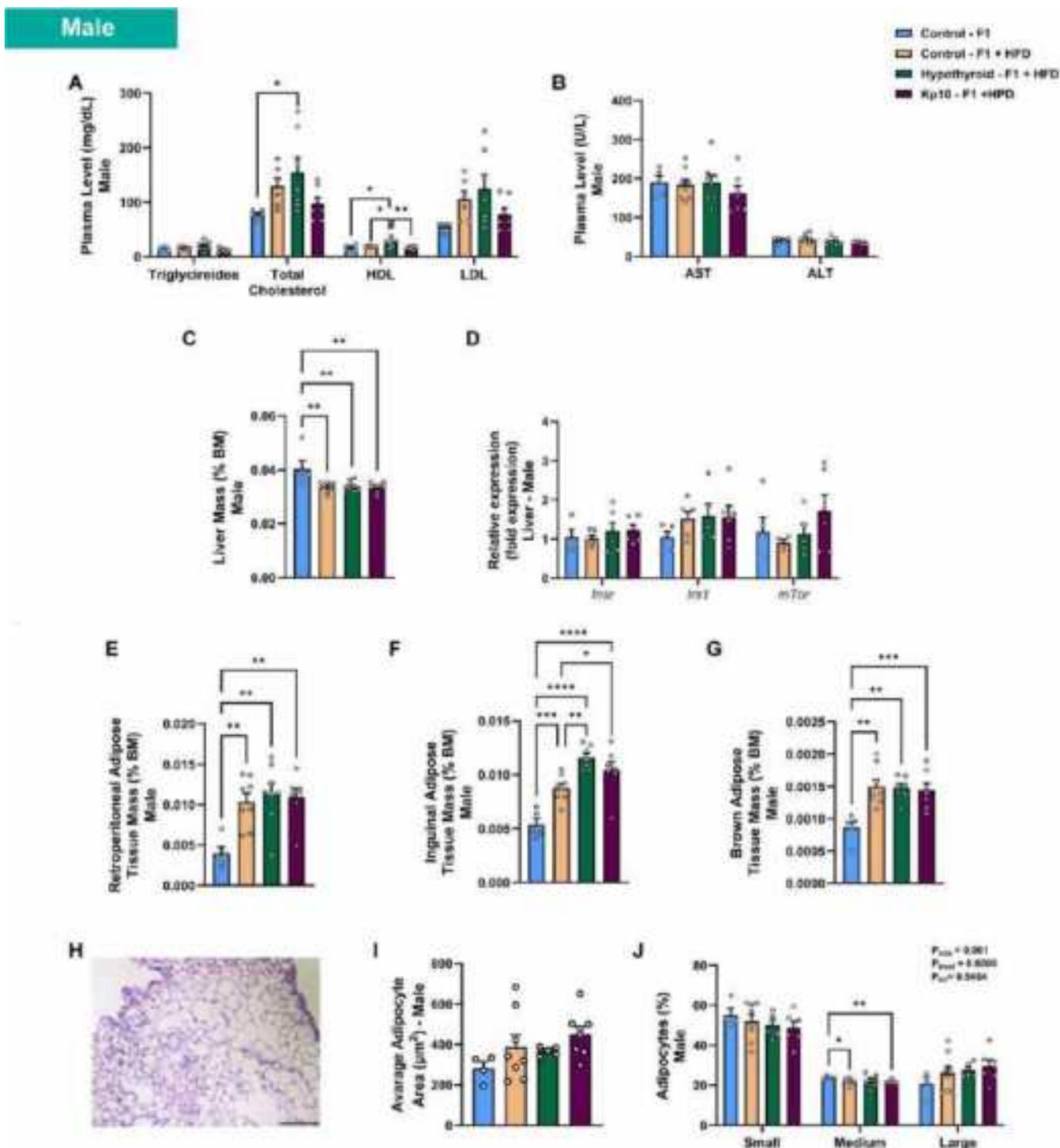


Figura 6 Avaliação hepática, da adiposidade e da bioquímica plasmática da prole macho exposta a dieta hiperlipídica de ratos controles, hipotireóides e hipotireóides tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Concentração plasmática de triglicéridos, Colesterol total, HDL e LDL. B) Concentração plasmática de AST e ALT. C) Massa relativa do fígado. D) Expressão gênica de *Insr*, *Irs1* e *mTor* no fígado. E) Massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal. F) Massa relativa do tecido adiposo inguinal. G) Massa relativa do tecido adiposo marrom. H) Fotomicrografia de tecido adiposo branco. I) Média da área dos adipócitos. J) Distribuição relativa dos tamanhos dos adipócitos. (A-I: Anova de uma via post hoc SNK, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média±SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. HFD = dieta hiperlipídica; W= semanas; BM= massa corporal; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase.

2145 *O tratamento materno com Kp10 não é capaz de bloquear o aumento exacerbado de tecido*
2146 *adiposo retroperitoneal e marrom causado pelo hipotireoidismo materno na prole fêmea*
2147 *exposta a dieta hiperlipídica*

2148 Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas na avaliação bioquímica
2149 dos lipídios (triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL) e biomarcadores de lesão hepática
2150 (AST e ALT) entre os grupos da prole fêmea ($P > 0,05$; Figura 7A-B), redução da massa
2151 hepática foi observada em todos os animais expostos à HFD comparado ao controle F1 ($P <$
2152 $0,05$, Figura 7C). Já na avaliação da expressão gênica no fígado, o HM reduziu os transcritos
2153 gênicos de *Insr* comparado aos grupos controle F1 e controle F1 + HFD ($P < 0,05$), enquanto
2154 o tratamento com Kp10 melhorou essa alteração, pois não apresentou diferenças significativas
2155 comparado aos demais grupos ($P > 0,05$; Figura 7H). Não foram observadas diferenças
2156 significativas na expressão de *Irs1* e *mTor* entre os grupos.

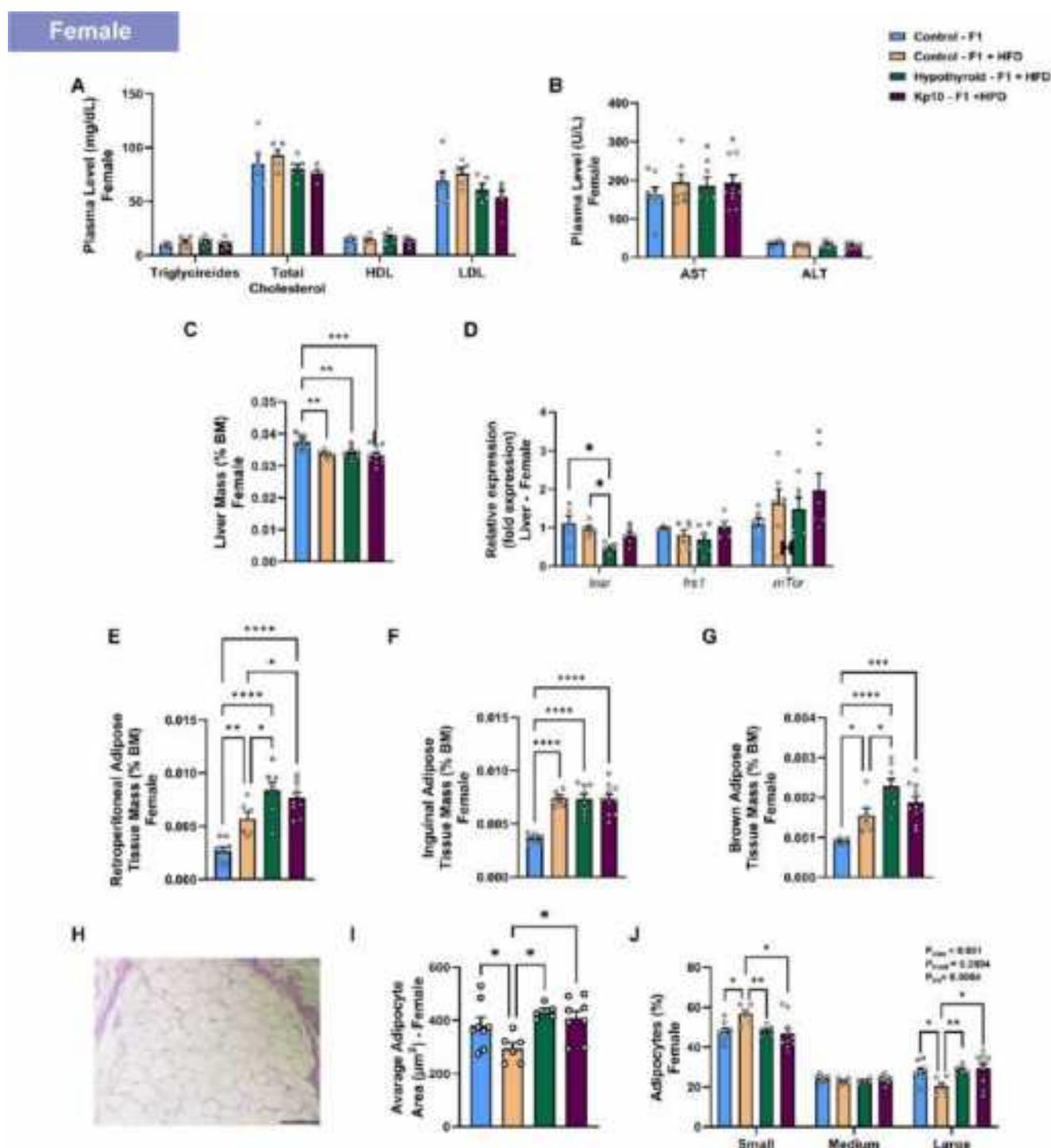
2157 Na avaliação dos tecidos adiposos, o grupo hipotireoideo F1+HFD apresentou um
2158 aumento acentuado na massa de gordura retroperitoneal comparado ao grupo controle F1+HFD
2159 ($P < 0,05$), que, por sua vez, estavam maiores em relação ao controle F1 ($P < 0,01$, $P < 0,0001$).
2160 O tratamento materno com Kp10, por outro lado, não afetou essa alteração causada pelo HM
2161 ($P < 0,05$, $P < 0,0001$, Figura 7E). A dieta hiperlipídica aumentou a massa de tecido inguinal
2162 em todos os grupos que foram expostos a ela comparado ao controle F1 ($P < 0,0001$, Figura
2163 7F). Porém, na avaliação do tecido adiposo marrom, foi observado que o HM exacerbou o
2164 aumento da massa tecidual comparado aos grupos controle F1+HFD e controle F1 ($P < 0,05$;
2165 $P < 0,0001$), e que o tratamento com Kp10 não influenciou essa alteração ($P < 0,001$, $P <$
2166 $0,0001$, Figura 7G).

2167 Seguindo para a avaliação microscópica do tecido adiposo inguinal, foi observado que
2168 a dieta hiperlipídica diminuiu a média da área dos adipócitos na prole controle comparado ao
2169 controle F1 ($P < 0,05$), enquanto o HM preveniu essa alteração, uma vez que os grupos
2170 hipotireoideo F1+HFD e Kp10+HFD tiveram aumento da média da área comparado ao controle
2171 F1+HFD ($P < 0,05$), igualando ao controle F1 ($P > 0,05$). Essa alteração foi acompanhada de
2172 maior porcentagem de adipócitos pequenos e menor porcentagem de adipócitos grandes no
2173 grupo controle F1+HFD comparado aos demais grupos ($P < 0,05$, $P < 0,01$; Figura 7J).

2174

2175

2176



2177

Figura 7 Avaliação hepática, da adiposidade e da bioquímica plasmática da prole fêmea exposta a dieta hiperlipídica de ratos controles, hipotireoideas e hipotireoideas tratadas com Kisspeptina-10 (Kp10). A) Concentração plasmática de triglicerídeos, Colesterol total, HDL e LDL. B) Concentração plasmática de AST e ALT. C) Massa relativa do fígado. D) Expressão gênica de *Insr*, *Irs1* e *mTor* no fígado. E) Massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal. F) Massa relativa do tecido adiposo inguinal. G) Massa relativa do tecido adiposo marrom. H) Fotomicrografia de tecido adiposo branco. I) Média da área dos adipócitos. J) Distribuição relativa dos tamanhos dos adipócitos. (A-I: Anova de uma via post hoc SNK, J: Anova de duas vias post hoc SNK; Média \pm SEM). As diferenças significativas estão representadas por * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. HFD = dieta hiperlipídica; W = semanas; BM = massa corporal; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase.

2178 7.4. DISCUSSÃO

2179 Este estudo demonstrou que o hipotireoidismo materno compromete a homeostase
2180 glicêmica da prole de forma sexo-específica, acelerando a disfunção metabólica induzida por
2181 dieta hiperlipídica. O tratamento materno com Kp10, por outro lado, mostrou-se eficaz em
2182 atenuar a disfunção glicêmica na prole causada pelo hipotireoidismo materno, inclusive quando
2183 exposta à HFD. Esses achados sugerem que a Kp10 pode ser um fármaco promissor em doenças
2184 metabólicas gestacionais visando melhorar a programação metabólica fetal e reduzir a
2185 ocorrência de disfunção glicêmica na idade adulta.

2186 O hipotireoidismo materno prolongou o tempo gestacional e reduziu a concentração
2187 plasmática de T4 livre na prole durante o período neonatal, como também na prole macho
2188 jovem, sugerindo um efeito sexo-dependente da hipofunção tireoidiana durante a gestação na
2189 programação metabólica da prole. Estudos anteriores já haviam demonstrado o aumento do
2190 período gestacional em modelos de hipotireoidismo induzido por PTU (FARAHANI et al.,
2191 2010) e por tireoidectomia (DAVID; ASIWE; FASANMADE, 2021), assim como a redução
2192 das concentrações de T4 livre na prole e recuperação do estado eutireoideo na vida adulta
2193 (BAGHERIPUOR et al., 2015; FARAHANI et al., 2010; JEDDI et al., 2020; KARBALAEI et
2194 al., 2014; LIU et al., 2019). Apesar do presente estudo ter observado baixas concentrações de
2195 T4 livre na prole macho, esse resultado é referente a animais ainda jovens (21 dias de idade),
2196 enquanto os demais trabalhos relatam recuperação dos níveis hormonais de T4 livre um mês
2197 após o nascimento (BAGHERIPUOR et al., 2015; FARAHANI et al., 2010; JEDDI et al., 2020;
2198 KARBALAEI et al., 2014; LIU et al., 2019).

2199 Os descendentes das ratas hipotireoideas, de ambos os sexos, apresentaram massa
2200 corporal reduzida durante a primeira semana de vida, seguida de um aparente *catch-up* no
2201 crescimento. Estudos prévios em modelos de hipotireoidismo induzido por PTU já
2202 demonstraram redução da massa corporal da prole ao longo da vida pós-natal
2203 (BAGHERIPUOR et al., 2015; GHOLAMI et al., 2017; JEDDI et al., 2020; KARBALAEI et
2204 al., 2013; LIU et al., 2019). Além disso, a RCIU também está associada ao *catch-up* no
2205 crescimento durante a vida pós-natal. No entanto, essa recuperação de peso é frequentemente
2206 acompanhada de resistência à insulina e maior risco metabólico (BERENDS et al., 2013;
2207 MORRISON et al., 2010), como foi observado no presente estudo. Estudos utilizando o mesmo
2208 modelo de hipotireoidismo materno já descreveram crescimento restrito decorrente dessa
2209 condição (DOS ANJOS CORDEIRO et al., 2024; SANTOS et al., 2022b, 2022c; SILVA et al.,
2210 2012) e demonstraram que a administração de Kp10 durante a gestação foi capaz de melhorar

2211 o desenvolvimento feto-placentário, apesar de não afetar significativamente a massa corporal
2212 fetal (SANTOS et al., 2022c). No entanto, em estudo realizado recentemente, verificou-se que
2213 o tratamento com Kp10 durante a gestação em ratas hipotireoideas foi capaz de melhorar a
2214 massa corporal pós-natal (dados não publicados), como também foi observado neste estudo.

2215 No entanto, apesar do efeito similar do tratamento materno com Kp10 no ganho de
2216 massa corporal da prole para ambos os sexos, foram observadas diferenças sexuais nos efeitos
2217 da disfunção tireoidiana sobre a homeostase glicêmica da prole antes e após o estresse
2218 metabólico induzido pela dieta HFD. Nos machos, foi observada uma desregulação persistente
2219 da sensibilidade à insulina, com resistência à insulina aos 30 dias de vida pós-natal e aumento
2220 da sensibilidade à insulina na fase adulta, sem alterações na tolerância à glicose. Estudos
2221 anteriores, como o de LIU *et al* (2019), também mostraram ausência de alterações na tolerância
2222 glicêmica na fase pré-puberal na prole macho de ratas hipotireoideas, acompanhada de redução
2223 da tolerância à glicose na idade adulta. Modelos de hipotireoidismo induzido por deficiência de
2224 iodo associada ao PTU, em camundongos, também relataram aumento da sensibilidade à
2225 insulina na prole macho adulta, apesar de terem também observado hiperinsulinemia e melhora
2226 na tolerância à glicose (KEMKEM et al., 2020). Por outro lado, outros estudos envolvendo
2227 modelos de hipotireoidismo fetal demonstraram intolerância à glicose e resistência à insulina
2228 na prole macho adulta, associadas à redução *in vitro* da secreção de insulina sob estímulo de
2229 glicose em ilhotas pancreáticas da prole (BAGHERIPUOR et al., 2015; FARAHANI et al.,
2230 2010; GHOLAMI et al., 2017; KARBALAEI et al., 2013, 2014).

2231 Quanto à prole fêmea, o hipotireoidismo materno causou intolerância à glicose e
2232 resistência à insulina aos 30 dias de vida, mas, na fase adulta, os animais reestabeleceram a
2233 homeostase glicêmica. Embora sejam escassos os estudos que avaliem a homeostase glicêmica
2234 de fêmeas antes da fase adulta, trabalhos prévios também relataram intolerância à glicose em
2235 modelos de hipotireoidismo induzido por PTU (JEDDI et al., 2020) e por tireoidectomia
2236 (DAVID; ASIWE; FASANMADE, 2021). Essas diferenças fenotípicas observadas entre a
2237 prole macho e fêmea podem estar relacionadas a variações hormonais, composição corporal,
2238 programação do desenvolvimento e fatores genéticos (ARIOGLU-INAN; KAYKI-MUTLU,
2239 2023). No entanto, são necessários mais estudos para investigar os mecanismos associados ao
2240 dimorfismo sexual observado na prole de ratas com hipotireoidismo materno.

2241 O tratamento materno com Kp10, embora não tenha apresentado efeito aos 30 PN na
2242 prole macho, aos 60 PN aumentou a tolerância à glicose e teve uma tendência em restabelecer
2243 a sensibilidade à insulina. Já nas fêmeas, apesar de não melhorar a resistência à insulina
2244 observada aos 30 PN, melhorou a tolerância à glicose, inclusive em relação ao controle.

2245 Camundongos fêmeas com deleção sistêmica de *Kiss1r* (TOLSON et al., 2014; VELASCO et
2246 al., 2019) ou em órgãos periféricos (VELASCO et al., 2019) como em tecido adiposo marrom
2247 (TOLSON et al., 2020) desenvolvem intolerância à glicose, enquanto os machos mantêm a
2248 tolerância à glicose normal. Vale ressaltar que estudos já demonstraram redução da expressão
2249 de *Kiss1r*/KISS1R na placenta (SANTOS et al., 2022b), útero (DA SILVA et al., 2025b) e
2250 testículo (SANTOS et al., 2023b) de ratos hipotireoideos. Dessa forma, é plausível que a
2251 desregulação na homeostase glicêmica observada neste estudo na prole das ratas hipotireoideas,
2252 especialmente nas fêmeas, seja resultante de falhas na expressão periférica do eixo Kiss1/Kiss1r
2253 em órgãos metabólicos, como o fígado e o tecido adiposo, embora mais estudos sejam
2254 necessários para confirmar essa hipótese.

2255 Considerando os efeitos positivos do tratamento materno com Kp10 na homeostase
2256 glicêmica da prole fêmea, é possível que este peptídeo também seja capaz de modular a
2257 sinalização insulínica ou fatores associados a regulação glicêmica. Neste sentido,
2258 demonstramos recentemente o aumento da expressão de IGF1/IGF1r e da sinalização mTOR
2259 na placenta (dados não publicados) e no fígado fetal (dados não publicados) de ratas
2260 hipotireoideas tratadas com Kp10, sugerindo outro mecanismo do efeito da kisspeptina sobre o
2261 metabolismo glicêmico da prole. Vale ressaltar que tanto o eixo IGF1/IGF1r como a via de
2262 sinalização mTOR são importantes reguladores do metabolismo glicêmico e da sinalização
2263 energética (KINEMAN; DEL RIO-MORENO; SARMENTO-CABRAL, 2018; LE BACQUER
2264 et al., 2013; SAXTON; SABATINI, 2017).

2265 Interessantemente, além do impacto do hipotireodismo materno na homeostase
2266 glicêmica da prole, verificamos que a prole fêmea é mais propensa a disfunção glicêmica
2267 quando exposta a um segundo desafio metabólico, como uma dieta hiperlipídica. Tanto a
2268 condição de hipotireoidismo quanto o tratamento com Kp10 não influenciaram a disfunção
2269 glicêmica na prole macho causada por dieta HFD, apesar da Kp10 ter restabelecido a massa
2270 corporal dos machos, que estava reduzida pela condição do hipotireoidismo materno. No
2271 entanto, a hipofunção tireoidiana materna agravou o aumento do colesterol total e da massa de
2272 tecido adiposo inguinal na prole macho após exposição a dieta hiperlipídica.

2273 A prole fêmea das ratas hipotireoideas, por outro lado, apesar de não apresentarem
2274 falhas na homeostase glicêmica aos 60 PN, desenvolveram intolerância à glicose mais
2275 precocemente após exposição a dieta HFD, acompanhada de acentuada resistência à insulina,
2276 que não foi influenciada pela hipofunção tireoidiana materna. Além disso, apresentaram
2277 redução hepática de *Insr* e maior massa de tecido adiposo retroperitoneal e marrom após
2278 exposição a dieta hiperlipídica. O tratamento materno com Kp10, por outro lado, foi capaz de

2279 não somente prevenir a disfunção glicêmica observada após 4 semanas de dieta HFD, como
2280 melhorou a tolerância à glicose e a expressão hepática de *Insr* após 6 semanas de dieta, além de
2281 restabelecer a sensibilidade a insulina, sugerindo o potencial deste peptídeo em modular
2282 positivamente a programação glicêmica da prole fêmea.

2283 Estudos prévios tem demonstrado que a deleção placentária de mTOR em camundongos
2284 causa intolerância à glicose e resistência à insulina na prole fêmea, além de aumentar a
2285 adiposidade após desafio com dieta HFD, enquanto a disfunção metabólica em machos causada
2286 pela dieta hiperlipídica não é influenciada pela deleção de mTOR (AKHAPHONG et al., 2021).
2287 Uma vez que a disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno está associada à
2288 redução da expressão placentária de mTOR e a administração de kisspeptina restabelece essa
2289 expressão (dados não publicados), sugerimos que a disfunção glicêmica na prole fêmea e seu
2290 agravamento causado pela dieta HFD sejam resultantes, pelo menos em parte, da redução
2291 placentária de mTOR (dados não publicados), sendo a kisspeptina uma modulador positivo
2292 dessa sinalização e da homeostase glicêmica da prole. Vale ressaltar que a expressão
2293 suprafisiológica de mTOR placentário em camundongos, estimulada geneticamente pela
2294 deleção de TSC2, seu bloqueador natural, melhora a tolerância à glicose da prole fêmea sem
2295 alterar a sensibilidade à insulina quando desafiadas com dieta HFD (AKHAPHONG et al.,
2296 2021), corroborando com a hipótese deste estudo.

2297 Além disso, o maior aumento de massa de tecido adiposo marrom causado pela dieta
2298 HFD observado na prole fêmea das ratas hipotireoideas pode justificar o retardo no ganho de
2299 massa corporal observado nesses animais, uma vez que o tecido adiposo marrom aumenta a
2300 termogênese e, conseqüentemente, a lipólise e a resistência ao ganho de massa corporal
2301 (HARMS; SEALE, 2013). Isso justifica o aumento dos adipócitos grandes e redução dos
2302 pequenos na prole fêmea proveniente das ratas hipotireoideas, uma vez que os adipócitos
2303 grandes apresentam maior capacidade lipolítica (LAURENCIKIENE et al., 2011). A
2304 diminuição da expressão hepática de *Insr* observada na prole fêmea das ratas hipotireoideas
2305 também pode ser uma resposta compensatória ao aumento da sensibilidade à insulina
2306 apresentado por esses animais após 6 semanas de dieta hiperlipídica (CHEN et al., 2019).

2307 Os achados deste estudo demonstraram que o hipotireoidismo materno compromete a
2308 homeostase glicêmica da prole de maneira sexo-específica, e que o tratamento materno com
2309 Kp10 melhora a programação glicêmica da prole fêmea, inclusive após exposição a dieta
2310 hiperlipídica. Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da Kp10 na programação metabólica
2311 glicêmica da prole e sugere que o uso de kisspeptina durante a gestação pode ser uma ferramenta
2312 promissora para a prevenção ou atenuação de disfunção metabólica na prole em idade adulta.

2313 **REFERÊNCIAS**

- 2314 ABDELKAREEM, A. O. et al. Immunohistochemistry of Leukemia Inhibitory Factor and
2315 Integrin $\alpha V\beta 3$ in Mouse Endometrium Following Kisspeptin-54 Ovulation Trigger.
2316 **Reproductive Sciences**, n. 0123456789, 2023.
- 2317 ABDELMAGEED, M. E. et al. Protocatechuic acid improves hepatic insulin resistance and
2318 restores vascular oxidative status in type-2 diabetic rats. **Environmental Toxicology and**
2319 **Pharmacology**, v. 83, p. 103577, abr. 2021.
- 2320 ADALI, E. et al. Metastin levels in pregnancies complicated by pre-eclampsia and their
2321 relation with disease severity. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n.
2322 12, p. 2671–2675, 23 dez. 2012.
- 2323 ADU-GYAMFI, E. A.; WANG, Y.-X.; DING, Y.-B. The interplay between thyroid hormones
2324 and the placenta: a comprehensive review†. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 8–17,
2325 12 set. 2020.
- 2326 AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. Transgenerational developmental programming. **Human**
2327 **Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 63–75, 2014.
- 2328 AKHAPHONG, B. et al. Placental mTOR complex 1 regulates fetal programming of obesity
2329 and insulin resistance in mice. **JCI Insight**, v. 6, n. 13, p. 1–16, 8 jul. 2021.
- 2330 ALAWAD, Z. M.; AL-OMARY, H. L. Maternal and cord blood prolactin level and
2331 pregnancy complications. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 35, n. 4, 10 jul. 2019.
- 2332 ALTMAN, D. Analysis of serial measurements. **Bmj**, v. 300, n. JANUARY, p. 230–236,
2333 1990.
- 2334 ANDREOZZI, F. et al. Plasma kisspeptin levels are associated with insulin secretion in
2335 nondiabetic individuals. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–9, 2017.
- 2336 ANGOA-PÉREZ, M. et al. Brain serotonin determines maternal behavior and offspring
2337 survival. **Genes, Brain and Behavior**, v. 13, n. 7, p. 579–591, 28 set. 2014.
- 2338 AOUCHE, R. et al. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. **International**
2339 **journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1496, 17 maio 2018.
- 2340 APLIN, J. D. et al. Tracking placental development in health and disease. **Nature Reviews**
2341 **Endocrinology**, v. 16, n. 9, p. 479–494, 2020.
- 2342 ARDESTANI, A.; MAEDLER, K. mTORC1 and IRS1: Another Deadly Kiss. **Trends in**
2343 **Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 737–739, 2018.
- 2344 ARIOGLU-INAN, E.; KAYKI-MUTLU, G. Sex Differences in Glucose Homeostasis. In: [s.l.:
2345 s.n.]. p. 219–239.
- 2346 ARMSTRONG, R. A. et al. Decreased serum levels of kisspeptin in early pregnancy are
2347 associated with intra-uterine growth restriction and pre-eclampsia. **Prenatal Diagnosis**, v. 29,
2348 n. 10, p. 982–985, 6 out. 2009.
- 2349 BABA, T. et al. Menstrual cyclic change of metastin / GPR54 in endometrium. **Medical**
2350 **Molecular Morphology**, p. 76–84, 2015.
- 2351 BAGHERIPUOR, F. et al. Comparison of the effects of fetal hypothyroidism on glucose
2352 tolerance in male and female rat offspring. **The journal of physiological sciences : JPS**, v.

- 2353 65, n. 2, p. 179–85, mar. 2015.
- 2354 BALCAZAR, N. et al. mTORC1 activation regulates β -cell mass and proliferation by
2355 modulation of cyclin D2 synthesis and stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.
2356 12, p. 7832–7842, 2009.
- 2357 BARKER, D. J. P. et al. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **British**
2358 **Medical Journal**, v. 301, n. 6746, p. 259–262, 1990.
- 2359 BAUMANN, M. U. et al. Regulation of human trophoblast GLUT1 glucose transporter by
2360 Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I). **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2014.
- 2361 BEETCH, M. et al. Impact of placental mTOR deficiency on peripheral insulin signaling in
2362 adult mice offspring. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 71, n. 4, 29 set. 2023.
- 2363 BEETCH, M.; ALEJANDRO, E. U. Placental mTOR Signaling and Sexual Dimorphism in
2364 Metabolic Health across the Lifespan of Offspring. **Children**, v. 8, n. 11, p. 970, 26 out. 2021.
- 2365 BENNETT, C. F.; LATORRE-MURO, P.; PUIGSERVER, P. Mechanisms of mitochondrial
2366 respiratory adaptation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 12, p. 817–835, 8
2367 dez. 2022.
- 2368 BERENDS, L. M. et al. Catch-up growth following intra-uterine growth-restriction
2369 programmes an insulin-resistant phenotype in adipose tissue. **International Journal of**
2370 **Obesity**, v. 37, n. 8, p. 1051–1057, 11 ago. 2013.
- 2371 BILBAN, M. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological
2372 invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p.
2373 1319–1328, 15 mar. 2004.
- 2374 BIONDI, B.; KAHALY, G. J.; ROBERTSON, R. P. Thyroid Dysfunction and Diabetes
2375 Mellitus: Two Closely Associated Disorders. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 3, p. 789–824, 1
2376 jun. 2019.
- 2377 BORGES, M. H. et al. Human placental GLUT1 glucose transporter expression and the fetal
2378 insulin-like growth factor axis in pregnancies complicated by diabetes. **Biochimica et**
2379 **biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1865, n. 9, p. 2411–2419, 1 set. 2019.
- 2380 BOWE, J. E. et al. Kisspeptin stimulation of insulin secretion: Mechanisms of action in
2381 mouse islets and rats. **Diabetologia**, v. 52, n. 5, p. 855–862, 2009.
- 2382 BOWE, J. E. et al. GPR54 peptide agonists stimulate insulin secretion from murine, porcine
2383 and human islets. **Islets**, v. 4, n. 1, p. 20–23, 2012.
- 2384 BOWE, J. E. et al. A role for placental kisspeptin in β cell adaptation to pregnancy. **JCI**
2385 **Insight**, v. 4, n. 20, 2019.
- 2386 BOWMAN, C. E.; ARANY, Z.; WOLFGANG, M. J. Regulation of maternal–fetal metabolic
2387 communication. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1455–1486, 21 fev.
2388 2021.
- 2389 BRENTA, G. Why Can Insulin Resistance Be a Natural Consequence of Thyroid
2390 Dysfunction? **Journal of Thyroid Research**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- 2391 BRETT, K. E. et al. Maternal–Fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: The role of
2392 the placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16153–16185,
2393 2014.

- 2394 BRIFFA, J. F. et al. Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters
2395 expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters.
2396 **Placenta**, v. 59, p. 30–38, 2017.
- 2397 BURTON, G. J. et al. **The Placenta and Human Developmental Programming**.
2398 Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- 2399 BURTON, G. J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **BMJ**, v. 366,
2400 p. 12381, 15 jul. 2019.
- 2401 BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L.; THORNBURG, K. L. Placental origins of chronic
2402 disease. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1509–1565, 2016.
- 2403 BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth
2404 restriction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 2, p. S745–S761, 1
2405 fev. 2018.
- 2406 CALDER, M. et al. Implantation failure in female Kiss1^{-/-} mice is independent of their
2407 hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. **Endocrinology**,
2408 v. 155, n. 8, p. 3065–3078, 1 ago. 2014.
- 2409 CAO, Y. et al. Kisspeptin-10 Maintains the Activation of the mTOR Signaling Pathway by
2410 Inhibiting SIRT6 to Promote the Synthesis of Milk in Bovine Mammary Epithelial Cells.
2411 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 14, p. 4093–4100, 2021.
- 2412 CAPOBIANCO, E. et al. Supplementation with polyunsaturated fatty acids in pregnant rats
2413 with mild diabetes normalizes placental PPAR γ and mTOR signaling in female offspring
2414 developing gestational diabetes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 53, p. 39–47,
2415 mar. 2018.
- 2416 CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its
2417 receptor in pre-eclampsia. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 79–85, jul. 2012.
- 2418 CARVALHO, D. P. et al. Gaps in the knowledge of thyroid hormones and placental biology.
2419 **Biology of Reproduction**, v. 106, n. 6, p. 1033–1048, 13 jun. 2022.
- 2420 CASTELLANO, J. M. et al. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of
2421 ovulation? **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4852–62, 1 out. 2006.
- 2422 CENTANNI, M.; BENVENGA, S.; SACHMECHI, I. Diagnosis and management of
2423 treatment-refractory hypothyroidism: an expert consensus report. **Journal of**
2424 **Endocrinological Investigation**, v. 40, n. 12, p. 1289–1301, 10 dez. 2017.
- 2425 ĆETKOVIĆ, A. et al. Plasma kisspeptin levels in pregnancies with diabetes and hypertensive
2426 disease as a potential marker of placental dysfunction and adverse perinatal outcome.
2427 **Endocrine Research**, v. 37, n. 2, p. 78–88, 10 maio 2012.
- 2428 CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A. Placentation in different mammalian species.
2429 **Annales d'Endocrinologie**, v. 77, n. 2, p. 67–74, 1 jun. 2016.
- 2430 CHAVATTE-PALMER, P.; COUTURIER-TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D.
2431 Intra-uterine programming of future fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, 9 nov.
2432 2023.
- 2433 CHEN, C.-Y. Y. C.-P. P.; CHEN, C.-Y. Y. C.-P. P.; LIN, K.-H. H. Biological functions of
2434 thyroid hormone in placenta. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p.
2435 4161–79, 16 fev. 2015.

- 2436 CHEN, Y. et al. Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and
2437 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5007, 10 out. 2019.
- 2438 CHRISTOFOROU, E. R.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Molecular mechanisms governing
2439 offspring metabolic programming in rodent models of in utero stress. **Cellular and**
2440 **Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 23, p. 4861–4898, 3 dez. 2020.
- 2441 CINDROVA-DAVIES, T. et al. Nuclear factor- κ B, p38, and stress-activated protein kinase
2442 mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and
2443 apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: Effects of antioxidant
2444 vitamins. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1511–1520, maio 2007.
- 2445 COAN, P. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Developmental dynamics of the
2446 definitive mouse placenta assessed by stereology. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p.
2447 1806–1813, 2004.
- 2448 COSTA, M. A. **The endocrine function of human placenta: An overview. Reproductive**
2449 **BioMedicine Online** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2016.
- 2450 DA SILVA, A. L. et al. Manganese porphyrin [MnTE-2-PyP]⁵⁺ improves maternal and
2451 offspring glycemic homeostasis and placental morphology and redox status in rats with
2452 gestational diabetes mellitus. **Redox Biology**, 2025a.
- 2453 DA SILVA, T. Q. M. et al. Hypothyroidism Alters Uterine Kisspeptin System and Activity
2454 Modulators in Cyclic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 2, p. 543,
2455 10 jan. 2025b.
- 2456 DAVID, U. E.; ASIWE, J. N.; FASANMADE, A. A. Maternal hypothyroidism prolongs
2457 gestation period and impairs glucose tolerance in offspring of Wistar rats. **Hormone**
2458 **Molecular Biology and Clinical Investigation**, 2021.
- 2459 DE CLERCQ, K. et al. Double-label immunohistochemistry to assess labyrinth structure of
2460 the mouse placenta with stereology. **Placenta**, v. 94, p. 44–47, maio 2020.
- 2461 DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-
2462 derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100,
2463 n. 19, p. 10972–10976, 16 set. 2003.
- 2464 DOS ANJOS CORDEIRO, J. M. et al. Maternal hypothyroidism causes oxidative stress and
2465 endoplasmic reticulum stress in the maternal-fetal interface of rats. **Free Radical Biology and**
2466 **Medicine**, v. 191, n. January, p. 24–39, out. 2022.
- 2467 DOS ANJOS CORDEIRO, J. M. et al. Manganese porphyrin-based treatment improves fetal-
2468 placental development and protects against oxidative damage and NLRP3 inflammasome
2469 activation in a rat maternal hypothyroidism model. **Redox Biology**, v. 74, n. June, p. 103238,
2470 ago. 2024.
- 2471 DUDEK, M. et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54
2472 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat,
2473 pancreas and liver) in male rats. **Neuropeptides**, v. 56, p. 41–49, abr. 2016.
- 2474 EBELING, P.; KOISTINEN, H. A.; KOIVISTO, V. A. Insulin-independent glucose transport
2475 regulates insulin sensitivity. **FEBS Letters**, v. 436, n. 3, p. 301–303, 9 out. 1998.
- 2476 ESHKOLI, T. et al. Maternal Hypothyroidism during Pregnancy and the Risk of Pediatric
2477 Endocrine Morbidity in the Offspring. **American Journal of Perinatology**, v. 36, n. 09, p.

- 2478 975–980, 26 jul. 2019.
- 2479 FARAHANI, H. et al. The effect of maternal hypothyroidism on the carbohydrate metabolism
2480 and insulin secretion of isolated islets in adult male offspring of rats. **Hormone and**
2481 **Metabolic Research**, v. 42, n. 11, p. 792–797, 2010.
- 2482 FORHEAD, A. J.; FOWDEN, A. L. Thyroid hormones in fetal growth and prepartum
2483 maturation. **Journal of Endocrinology**, v. 221, n. 3, p. R87–R103, jun. 2014.
- 2484 FOTAKIS, C. et al. Uncontrolled Thyroid during Pregnancy Alters the Circulative and
2485 Exerted Metabolome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4248, 12
2486 abr. 2022.
- 2487 FOWDEN, A. L. et al. The placenta and intrauterine programming. **Journal of**
2488 **neuroendocrinology**, v. 20, n. 4, p. 439–50, abr. 2008.
- 2489 FRANCIS, V. A. et al. Kisspeptin Regulation of Genes Involved in Cell Invasion and
2490 Angiogenesis in First Trimester Human Trophoblast Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99680,
2491 12 jun. 2014.
- 2492 GALARRAGA, M. et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose
2493 tissue cellularity in histological sections. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2791–
2494 2796, dez. 2012.
- 2495 GALLO, L. A. et al. Cardio-renal and metabolic adaptations during pregnancy in female rats
2496 born small: implications for maternal health and second generation fetal growth. **The Journal**
2497 **of Physiology**, v. 590, n. 3, p. 617–630, 10 fev. 2012.
- 2498 GE, G. M. et al. Maternal Thyroid Dysfunction During Pregnancy and the Risk of Adverse
2499 Outcomes in the Offspring: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Journal of**
2500 **Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 12, p. 3821–3841, 1 dez. 2020.
- 2501 GHOLAMI, H. et al. Transient Congenital Hypothyroidism Alters Gene Expression of
2502 Glucose Transporters and Impairs Glucose Sensing Apparatus in Young and Aged Offspring
2503 Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. 2338–2352, 2017.
- 2504 GLUCKMAN, P. D. et al. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and
2505 Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61–73, 2008.
- 2506 GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Living with the past: Evolution, development, and
2507 patterns of disease. **Science**, v. 305, n. 5691, p. 1733–1736, 2004.
- 2508 GODOY, G. A. F. et al. Maternal thyroid hormones during pregnancy, childhood adiposity
2509 and cardiovascular risk factors: The Generation R Study. **Clinical Endocrinology**, v. 81, n. 1,
2510 p. 117–125, 2014.
- 2511 GONG, L. L.; LIU, H.; LIU, L. H. Relationship between hypothyroidism and the incidence of
2512 gestational diabetes: A meta-analysis. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.
2513 55, n. 2, p. 171–175, 2016.
- 2514 GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. The role of kisspeptin in immune tolerance
2515 formation during pregnancy. **Doklady Biological Sciences**, v. 457, n. 1, p. 258–260, 30 jul.
2516 2014.
- 2517 GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. Role of Kisspeptin in Regulation of Reproductive
2518 and Immune Reactions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 8, p. 839–853, 2020.

- 2519 GUO, J. et al. Prenatal dexamethasone exposure exerts sex-specific effect on placental oxygen
2520 and nutrient transport ascribed to the differential expression of IGF2. **Annals of**
2521 **Translational Medicine**, v. 8, n. 5, p. 233–233, mar. 2020.
- 2522 HAGHIR, H. et al. Sexual Dimorphism in Expression of Insulin and Insulin-Like Growth
2523 Factor-I Receptors in Developing Rat Cerebellum. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.
2524 33, n. 3, p. 369–377, 16 abr. 2013.
- 2525 HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic
2526 potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.
- 2527 HARRIS, S. E. et al. Hypothyroidism in utero stimulates pancreatic beta cell proliferation and
2528 hyperinsulinaemia in the ovine fetus during late gestation. **Journal of Physiology**, v. 595, n.
2529 11, p. 3331–3343, 2017.
- 2530 HAUGE-EVANS, A. C. et al. A role for kisspeptin in islet function. **Diabetologia**, v. 49, n. 9,
2531 p. 2131–2135, 2006.
- 2532 HERREBOUDT, A. M. et al. Kiss1 mutant placentas show normal structure and function in
2533 the mouse. **Placenta**, v. 36, n. 1, p. 52–58, 2015.
- 2534 HIDEN, U. et al. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic
2535 pregnancies. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 1, p. 60–68, 22 jul. 2009.
- 2536 HILL, D. J. Placental control of metabolic adaptations in the mother for an optimal pregnancy
2537 outcome. What goes wrong in gestational diabetes? **Placenta**, v. 69, p. 162–168, set. 2018.
- 2538 HOFFMAN, D. J. et al. Developmental origins of metabolic diseases. **Physiological Reviews**,
2539 v. 101, n. 3, p. 739–795, 1 jul. 2021.
- 2540 HORIKOSHI, Y. et al. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human
2541 pregnancy: Metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Journal of Clinical**
2542 **Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 914–919, 1 fev. 2003.
- 2543 HU, K.-L. L. et al. Kisspeptin as a potential biomarker throughout pregnancy. **European**
2544 **Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 240, n. 1, p. 261–266,
2545 1 set. 2019.
- 2546 HUDSON, A. D.; KAUFFMAN, A. S. Metabolic actions of kisspeptin signaling: Effects on
2547 body weight, energy expenditure, and feeding. **Pharmacology and Therapeutics**, n. xxxx, p.
2548 107974, 2021.
- 2549 HUFNAGEL, A. et al. Programming of cardiometabolic health: the role of maternal and fetal
2550 hyperinsulinaemia. **Journal of Endocrinology**, v. 253, n. 2, p. R47–R63, 1 maio 2022.
- 2551 HUNG, T.-H.; WU, C.-P.; CHEN, S.-F. Differential Changes in Akt and AMPK
2552 Phosphorylation Regulating mTOR Activity in the Placentas of Pregnancies Complicated by
2553 Fetal Growth Restriction and Gestational Diabetes Mellitus With Large-For-Gestational Age
2554 Infants. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 6 dez. 2021.
- 2555 IBANOGLU, M. C. et al. Comparison of the Kisspeptin levels in early onset preeclampsia
2556 and late-onset preeclampsia. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 306, n. 4, p. 991–
2557 996, 2022.
- 2558 ILIE, M. et al. Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in
2559 multiple automated immunohistochemistry platforms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0183023,
2560 ago. 2017.

- 2561 IZZI-ENGBEAYA, C. et al. The effects of kisspeptin on β -cell function, serum metabolites
2562 and appetite in humans. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. 12, p. 2800–2810,
2563 2018.
- 2564 IZZI-ENGBEAYA, C.; HILL, T. G.; BOWE, J. E. Kisspeptin and Glucose Homeostasis.
2565 **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 37, n. 3, p. 141–146, 2019.
- 2566 JAMES, S. R.; FRANKLYN, J. A.; KILBY, M. D. Placental transport of thyroid hormone.
2567 **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 2, p. 253–
2568 264, jun. 2007.
- 2569 JAYASENA, C. N. et al. The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show
2570 sexual dimorphism in humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96,
2571 n. 12, p. 1963–1972, 1 dez. 2011.
- 2572 JAYASENA, C. N. et al. The identification of elevated urinary kisspeptin-immunoreactivity
2573 during pregnancy. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory
2574 Medicine**, v. 52, n. 3, p. 395–398, 28 maio 2015.
- 2575 JEDDI, S. et al. Effect of Fetal and Neonatal Hypothyroidism on Glucose Tolerance in
2576 Middle- Aged Female Rats. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v.
2577 21, n. 9, p. 1627–1633, 2020.
- 2578 KAPUSTIN, R. V. et al. Placental protein expression of kisspeptin-1 (KISS1) and the
2579 kisspeptin-1 receptor (KISS1R) in pregnancy complicated by diabetes mellitus or
2580 preeclampsia. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 2, p. 437–445, 6 fev. 2020.
- 2581 KARBALAEI, N. et al. Comparison of the effect of maternal hypothyroidism on carbohydrate
2582 metabolism in young and aged male offspring in rats. **Scandinavian Journal of Clinical and
2583 Laboratory Investigation**, v. 73, n. 1, p. 87–94, 1 fev. 2013.
- 2584 KARBALAEI, N. et al. The possible mechanisms by which maternal hypothyroidism impairs
2585 insulin secretion in adult male offspring in rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 4, p.
2586 701–714, 2014.
- 2587 KAUR, R.; GUPTA, K. Endocrine dysfunction and recurrent spontaneous abortion: An
2588 overview. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 79,
2589 2016.
- 2590 KEMKEM, Y. et al. Maternal hypothyroidism in mice influences glucose metabolism in adult
2591 offspring. **Diabetologia**, v. 63, n. 9, p. 1822–1835, set. 2020.
- 2592 KENT, N. L. et al. Maternal hypothyroidism in rats impairs placental nutrient transporter
2593 expression, increases labyrinth zone size, and impairs fetal growth. **Placenta**, v. 139, p. 148–
2594 158, ago. 2023.
- 2595 KENT, N. L.; ATLURI, S. C.; CUFFE, J. S. M. Maternal Hypothyroidism in Rats Reduces
2596 Placental Lactogen, Lowers Insulin Levels, and Causes Glucose Intolerance. **Endocrinology**,
2597 v. 163, n. 2, p. 1–22, 2022.
- 2598 KINEMAN, R. D.; DEL RIO-MORENO, M.; SARMENTO-CABRAL, A. 40 YEARS of
2599 IGF1: Understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using
2600 the Cre/loxP system. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 61, n. 1, p. T187–T198, jul.
2601 2018.
- 2602 KISS, A. C. et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal

- 2603 outcomes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 1, n. 1, p. 21, 2009.
- 2604 KOBAYASHI, K. et al. Dose-dependent effects of perinatal hypothyroidism on postnatal
2605 testicular development in rat offspring. **The Journal of toxicological sciences**, v. 39, n. 6, p.
2606 867–874, 2014.
- 2607 KOŁODZIEJSKI, P. A. et al. Serum levels of spexin and kisspeptin negatively correlate with
2608 obesity and insulin resistance in women. **Physiological Research**, v. 67, n. 1, p. 45–56, 2018.
- 2609 KOTANI, M. et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural
2610 Ligands of the Orphan G Protein-coupled Receptor GPR54. **Journal of Biological**
2611 **Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34631–34636, 14 set. 2001.
- 2612 KRAMER, A. C. et al. Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring
2613 development and metabolism. **Development**, v. 150, n. 20, 15 out. 2023.
- 2614 KRISHNAPURAM, R. et al. Insulin receptor-independent upregulation of cellular glucose
2615 uptake. **International Journal of Obesity**, v. 37, n. 1, p. 146–153, 7 jan. 2013.
- 2616 KURLAK, L. O. et al. Thyroid hormones and their placental deiodination in normal and pre-
2617 eclamptic pregnancy. **Placenta**, v. 34, n. 5, p. 395–400, maio 2013.
- 2618 LANGDOWN, M. L.; SUGDEN, M. C. Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression
2619 in dexamethasone-induced fetal growth retardation. **Molecular and Cellular Endocrinology**,
2620 v. 185, n. 1–2, p. 109–117, dez. 2001.
- 2621 LAPEHN, S.; PAQUETTE, A. G. The Placental Epigenome as a Molecular Link Between
2622 Prenatal Exposures and Fetal Health Outcomes Through the DOHaD Hypothesis. **Current**
2623 **Environmental Health Reports**, v. 9, n. 3, p. 490–501, 29 abr. 2022.
- 2624 LAURENCIKIENE, J. et al. Regulation of Lipolysis in Small and Large Fat Cells of the
2625 Same Subject. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 12, p.
2626 E2045–E2049, dez. 2011.
- 2627 LE BACQUER, O. et al. mTORC1 and mTORC2 regulate insulin secretion through Akt in
2628 INS-1 cells. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 21–29, jan. 2013.
- 2629 LECOUTRE, S. et al. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male
2630 offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. **Molecular Metabolism**, v.
2631 6, n. 8, p. 922–930, ago. 2017.
- 2632 LEE, C. K. et al. Circadian expression of *Mell1a* and *PL-II* genes in placenta: effects of
2633 melatonin on the *PL-II* gene expression in the rat placenta. **Molecular and Cellular**
2634 **Endocrinology**, v. 200, n. 1–2, p. 57–66, fev. 2003.
- 2635 LEE, J.-H. et al. *KiSS-1*, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene.
2636 **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–1737, 4 dez. 1996.
- 2637 LENKE, L. et al. A Dysregulation of the Prolactin/Vasoinhibin Axis Appears to Contribute to
2638 Preeclampsia. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 9 jan. 2020.
- 2639 LEÓN, S. et al. Beyond the brain-Peripheral kisspeptin signaling is essential for promoting
2640 endometrial gland development and function. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–17,
2641 2016.
- 2642 LI, W. et al. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation. **Applied**
2643 **Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6129–6140, 24 jul. 2020.

- 2644 LINENBERG, I. et al. Intergenerational effects of the antioxidant Idebenone on the placentas
2645 of rats with gestational diabetes mellitus. **Reproductive Toxicology**, v. 104, n. December
2646 2020, p. 16–26, 2021.
- 2647 LIU, Z. et al. LC–MS/MS quantification of a neuropeptide fragment kisspeptin-10 (NSC
2648 741805) and characterization of its decomposition product and pharmacokinetics in rats.
2649 **Journal of Chromatography B**, v. 926, p. 1–8, maio 2013.
- 2650 LIU, Z. et al. Impaired Glucose Metabolism in Young Offspring of Female Rats with
2651 Hypothyroidism. **Journal of diabetes research**, v. 2019, p. 4713906, 2019.
- 2652 LOGIE, J. J. et al. Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-
2653 eclampsia. **Clinical Endocrinology**, v. 76, n. 6, p. 887–893, jun. 2012.
- 2654 LOPEZ-TELLO, J. et al. Fetal manipulation of maternal metabolism is a critical function of
2655 the imprinted Igf2 gene. **Cell Metabolism**, v. 35, n. 7, p. 1195- 1208.e6, 2023.
- 2656 LUCACCIONI, L. et al. Long term outcomes of infants born by mothers with thyroid
2657 dysfunction during pregnancy. **Acta Biomedica**, v. 92, n. 1, p. 1–11, 2021.
- 2658 MAGUIRE, J. J. et al. Inotropic action of the puberty hormone kisspeptin in rat, mouse and
2659 human: cardiovascular distribution and characteristics of the kisspeptin receptor. **PloS one**, v.
2660 6, n. 11, p. e27601, 22 nov. 2011.
- 2661 MANGWIRO, Y. T. M. et al. Exercise initiated during pregnancy in rats born growth
2662 restricted alters placental mTOR and nutrient transporter expression. **The Journal of**
2663 **Physiology**, v. 597, n. 7, p. 1905–1918, abr. 2019.
- 2664 MARK, P. J. et al. Kiss1 and Kiss1r mRNA expression in the rat placenta: Changes with
2665 gestational age and regulation by glucocorticoids. **Placenta**, v. 34, n. 8, p. 657–662, ago.
2666 2013.
- 2667 MATJILA, M. et al. Elevated placental expression at the maternal-fetal interface but
2668 diminished maternal circulatory kisspeptin in preeclamptic pregnancies. **Pregnancy**
2669 **Hypertension**, v. 6, n. 1, p. 79–87, 1 jan. 2016.
- 2670 MAZUMDER, A. G.; PATIAL, V.; SINGH, D. Mycophenolate mofetil contributes to
2671 downregulation of the hippocampal interleukin type 2 and 1 β mediated PI3K/AKT/mTOR
2672 pathway hyperactivation and attenuates neurobehavioral comorbidities in a rat model of
2673 temporal lobe epilepsy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 75, p. 84–93, jan. 2019.
- 2674 MIAO, M. et al. Association of Maternal Hypothyroidism With Cardiovascular Diseases in
2675 the Offspring. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 31 ago. 2021.
- 2676 MORRISON, J. L. et al. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of
2677 insulin resistance and visceral obesity. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 4, p. 669–677, 22 abr.
2678 2010.
- 2679 MU, J. et al. In vivo quantification of embryonic and placental growth during gestation in
2680 mice using micro-ultrasound. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 1–13,
2681 2008.
- 2682 MULLUR, R.; LIU, Y.-Y.; BRENT, G. A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism.
2683 **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 355–382, abr. 2014.
- 2684 MUSA, E.; MATJILA, M.; LEVITT, N. S. Kisspeptins and Glucose Homeostasis in
2685 Pregnancy: Implications for Gestational Diabetes Mellitus—a Review Article. **Reproductive**

- 2686 **Sciences**, 2021.
- 2687 NAPSO, T. et al. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to
2688 Support Pregnancy and Lactation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–39, 17 ago.
2689 2018.
- 2690 NAPSO, T. et al. Advanced maternal age compromises fetal growth and induces sex-specific
2691 changes in placental phenotype in rats. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 16916, 28 dez. 2019.
- 2692 NAVARRO, V. M. Metabolic regulation of kisspeptin — the link between energy balance
2693 and reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 8, p. 407–420, 19 ago. 2020.
- 2694 NEWBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control of maternal
2695 metabolism and fetal growth. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v.
2696 18, n. 6, p. 409–416, dez. 2011.
- 2697 O'REILLY, K. E. et al. mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase
2698 Signaling and Activates Akt. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1500–1508, 1 fev. 2006.
- 2699 OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-
2700 coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, maio 2001.
- 2701 OLMOS-ORTIZ, A. et al. Immunoendocrine dysregulation during gestational diabetes
2702 mellitus: The central role of the placenta. **International Journal of Molecular Sciences**, v.
2703 22, n. 15, p. 1–33, 2021.
- 2704 PANAHANDEH, F. et al. Hypothyroidism and Fertility: An Animal Model follows up in The
2705 Second-Generation. **Cell journal**, v. 24, n. 3, p. 148–154, mar. 2022.
- 2706 PANTING, E. N. et al. The role of placental kisspeptin in trophoblast invasion and migration:
2707 an assessment in Kiss1r knockout mice, BeWo cell lines and human term placenta.
2708 **Reproduction, Fertility and Development**, v. 36, n. 11, p. 1–12, 8 jul. 2024.
- 2709 PEI, J. et al. Dysregulated GLUT1 results in the pathogenesis of preeclampsia by impairing
2710 the function of trophoblast cells. **Scientific reports**, v. 14, n. 1, p. 23761, 2024.
- 2711 PEREZ-RAMIREZ, C. A. et al. Atlas of fetal metabolism during mid-to-late gestation and
2712 diabetic pregnancy. **Cell**, v. 187, n. 1, p. 204- 215.e14, 2024.
- 2713 PERIMENIS, P. et al. Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human
2714 and rat maternal diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of**
2715 **Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1783–1793, set. 2014.
- 2716 PINTO, S. et al. Thyroid dysfunction during gestation and gestational diabetes mellitus: a
2717 complex relationship. **Journal of Endocrinological Investigation**, 7 abr. 2023.
- 2718 RANA, M.; JAIN, S.; CHOUBEY, P. Prolactin and its significance in the placenta.
2719 **Hormones**, v. 21, n. 2, p. 209–219, 11 jun. 2022.
- 2720 REN, J.; JIN, H.; ZHU, Y. The Role of Placental Non-Coding RNAs in Adverse Pregnancy
2721 Outcomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 5030, 6 mar. 2023.
- 2722 REYNOLDS, L. P. et al. Role of the placenta in developmental programming: Observations
2723 from models using large animals. **Animal Reproduction Science**, v. 257, n. August, p.
2724 107322, 2023.
- 2725 REYNOLDS, R. M. et al. A role for kisspeptins in pregnancy: Facts and speculations.

- 2726 **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 1–7, jul. 2009.
- 2727 ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. KiSS-1 system and reproduction: Comparative aspects and
2728 roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. **General and Comparative**
2729 **Endocrinology**, v. 153, n. 1–3, p. 132–140, ago. 2007.
- 2730 ROOS, S.; POWELL, T. L.; JANSSON, T. Placental mTOR links maternal nutrient
2731 availability to fetal growth. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 1, p. 295–298, 2009.
- 2732 SAAVEDRA, L. P. J. et al. Epigenetic programming for obesity and noncommunicable
2733 disease: From womb to tomb. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, 2 dez. 2023.
- 2734 SANTOS, B. R. et al. Kisspeptin treatment improves fetal-placental development and blocks
2735 placental oxidative damage caused by maternal hypothyroidism in an experimental rat model.
2736 **Placenta**, v. 122, n. 2022, p. 16, maio 2022a.
- 2737 SANTOS, B. R. et al. Maternal hypothyroidism reduces the expression of the
2738 kisspeptin/Kiss1r system in the maternal-fetal interface of rats. **Reproductive Biology**, v. 22,
2739 n. 2, p. 100615, jun. 2022b.
- 2740 SANTOS, B. R. et al. Kisspeptin treatment improves fetal-placental development and blocks
2741 placental oxidative damage caused by maternal hypothyroidism in an experimental rat model.
2742 **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 28 jul. 2022c.
- 2743 SANTOS, B. R. et al. Kisspeptin Suppresses Inflammasome-NLRP3 Activation and
2744 Pyroptosis Caused by Hypothyroidism at the Maternal-Fetal Interface of Rats. **International**
2745 **Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6820, 6 abr. 2023a.
- 2746 SANTOS, L. C. et al. Kisspeptin treatment reverses high prolactin levels and improves
2747 gonadal function in hypothyroid male rats. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 16819, 5 out.
2748 2023b.
- 2749 SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.
2750 **Cell**, v. 168, n. 6, p. 960–976, mar. 2017.
- 2751 SCHAEFER, J. et al. Uterine kisspeptin receptor critically regulates epithelial estrogen
2752 receptor α transcriptional activity at the time of embryo implantation in a mouse model.
2753 **Molecular Human Reproduction**, v. 27, n. 10, 29 set. 2021.
- 2754 SCHWETZ, T. A.; REISSAUS, C. A.; PISTON, D. W. Differential stimulation of insulin
2755 secretion by glp-1 and kisspeptin-10. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014.
- 2756 SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal**
2757 **of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 23 out. 2003.
- 2758 SEPÚLVEDA-MARTÍNEZ et al. Transgenerational transmission of small-for-gestational
2759 age. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 53, n. 5, p. 623–629, 2019.
- 2760 SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Maternal Insulin-Like Growth Factors-I and -II Act via
2761 Different Pathways to Promote Fetal Growth. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3344–3355, 1
2762 jul. 2006.
- 2763 SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Placental phenotype and the insulin-like growth factors:
2764 resource allocation to fetal growth. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 15, p. 5057–5093, 2017.
- 2765 SFERRUZZI-PERRI, A. N.; LOPEZ-TELLO, J.; SALAZAR-PETRES, E. Placental
2766 adaptations supporting fetal growth during normal and adverse gestational environments.

- 2767 **Experimental Physiology**, 9 dez. 2022.
- 2768 SHANG, M.; WEN, Z. Increased placental IGF-1/mTOR activity in macrosomia born to
2769 women with gestational diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 146, p. 211–
2770 219, dez. 2018.
- 2771 SHAO, X. et al. The mystery of the life tree: the placentas. **Biology of Reproduction**, v. 107,
2772 n. 1, p. 301–316, 25 jul. 2022.
- 2773 SHARMA, S.; GODBOLE, G.; MODI, D. Decidual Control of Trophoblast Invasion.
2774 **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 3, p. 341–350, 1 mar. 2016.
- 2775 SHIRSHEV, S. V. et al. The effect of kisspeptin on the functional characteristics of isolated
2776 NK cells. **Doklady Biological Sciences**, v. 464, n. 1, p. 267–9, 2015.
- 2777 SHRESTHA, A.; TRIPATHI, P.; DONGOL, A. Pregnancy Outcomes in Patients with
2778 Hypothyroidism. **Kathmandu University medical journal (KUMJ)**, v. 17, n. 65, p. 57–60,
2779 2019.
- 2780 SILVA, J. F. et al. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in
2781 proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility
2782 and Development**, v. 24, n. 7, p. 923, 2012.
- 2783 SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects
2784 placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration
2785 kinetics. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 147, n. 6, p. 803–16, 1 jun. 2014.
- 2786 SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal
2787 factors are affected by thyroid hormones in rats. **Pathology, research and practice**, v. 211, n.
2788 3, p. 226–34, 1 mar. 2015.
- 2789 SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Spatiotemporal expression profile of
2790 proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta
2791 before and during intrauterine trophoblast migration. **Reproduction, Fertility and
2792 Development**, v. 29, n. 9, p. 1774–1786, 2017.
- 2793 SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female
2794 reproduction†. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 907–921, 14 maio 2018.
- 2795 SILVA, J. F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of
2796 humans and rodents. **Cell Adhesion & Migration**, v. 10, n. 1–2, p. 88–110, 3 mar. 2016.
- 2797 SINZATO, Y. K. et al. Maternal Oxidative Stress, Placental Morphometry, and Fetal Growth
2798 in Diabetic Rats Exposed to Cigarette Smoke. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 9, p. 1287–
2799 1293, 1 set. 2019.
- 2800 SINZATO, Y. K. et al. Maternal Diabetes and Postnatal High-Fat Diet on Pregnant Offspring.
2801 **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 30 maio 2022.
- 2802 SMETS, E. M. L. et al. Decreased plasma levels of metastin in early pregnancy are associated
2803 with small for gestational age neonates. **Prenatal Diagnosis**, v. 28, n. 4, p. 299–303, abr.
2804 2008.
- 2805 SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: Pregnancy-specific
2806 hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and
2807 Endocrinology**, v. 2, p. 1–15, 2004.

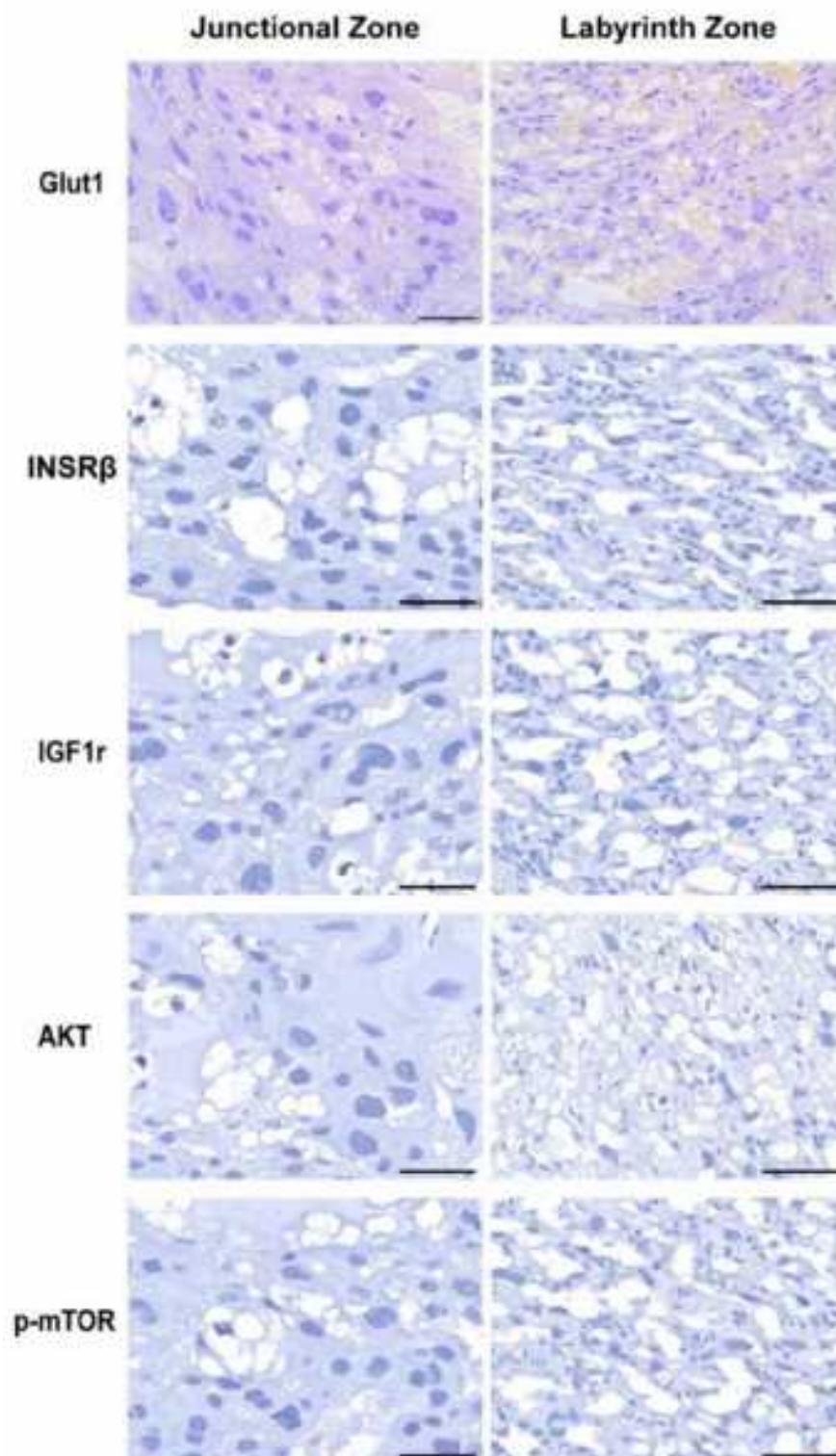
- 2808 SOARES, M. J. et al. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling
2809 during the establishment of pregnancy. **The International Journal of Developmental**
2810 **Biology**, v. 58, n. 2-3-4, p. 247-259, 2014.
- 2811 SOARES, M. J.; KONNO, T.; ALAM, S. M. K. The prolactin family: effectors of pregnancy-
2812 dependent adaptations. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 114-121,
2813 2007.
- 2814 SOLANO, M. E. et al. Identification of suitable reference genes in the mouse placenta.
2815 **Placenta**, v. 39, p. 7-15, mar. 2016.
- 2816 SONG, W.-J. J. et al. Glucagon regulates hepatic kisspeptin to impair insulin secretion. **Cell**
2817 **Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 667-681, abr. 2014.
- 2818 SOUZA, C. A. et al. Thyroid hormones affect decidualization and angiogenesis in the decidua
2819 and metrial gland of rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1002-1014, 2017.
- 2820 SOUZA, C. A. et al. Efeito do hipotireoidismo materno na expressão espaço-temporal de
2821 mediadores imunológicos e população de células natural killers na decídua e na glândula
2822 metrial de ratas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p.
2823 177-190, jan. 2020.
- 2824 STERN, C. et al. Placental endocrine activity: Adaptation and disruption of maternal glucose
2825 metabolism in pregnancy and the influence of fetal sex. **International Journal of Molecular**
2826 **Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.
- 2827 SULLIVAN-PYKE, C. et al. Kisspeptin as a new serum biomarker to discriminate
2828 miscarriage from viable intrauterine pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 109, n. 1, p. 137-
2829 141.e2, 1 jan. 2018.
- 2830 SULLIVAN, S. A. Hypothyroidism in Pregnancy. **Clinical Obstetrics & Gynecology**, v. 62,
2831 n. 2, p. 308-319, jun. 2019.
- 2832 SZLAPINSKI, S. K.; HILL, D. J. Metabolic Adaptations to Pregnancy in Healthy and
2833 Gestational Diabetic Pregnancies: The Pancreas - Placenta Axis. **Current Vascular**
2834 **Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 141-153, 30 dez. 2020.
- 2835 SZYDEŁKO-GORZKOWICZ, M. et al. The Role of Kisspeptin in the Pathogenesis of
2836 Pregnancy Complications: A Narrative Review. **International Journal of Molecular**
2837 **Sciences**, v. 23, n. 12, 2022.
- 2838 TAPIA-MARTÍNEZ, J. et al. Maternal Thyroid Hormone Deficiency during Gestation and
2839 Lactation Alters Metabolic and Thyroid Programming of the Offspring in the Adult Stage.
2840 **Hormone and Metabolic Research**, v. 51, n. 6, p. 381-388, 2019.
- 2841 TERAQ, Y. et al. Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant
2842 cells of the rat placenta. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**,
2843 v. 1678, n. 2-3, p. 102-110, 25 maio 2004.
- 2844 TOLSON, K. P. et al. Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes
2845 glucose intolerance and obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 3075-9,
2846 jul. 2014.
- 2847 TOLSON, K. P. et al. Conditional knockout of kisspeptin signaling in brown adipose tissue
2848 increases metabolic rate and body temperature and lowers body weight. **The FASEB**
2849 **Journal**, v. 34, n. 1, p. 107-121, 19 jan. 2020.

- 2850 TSAI, K. et al. Differential expression of mTOR related molecules in the placenta from
2851 gestational diabetes mellitus (GDM), intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia
2852 patients. **Reproductive Biology**, v. 21, n. 2, p. 100503, 2021.
- 2853 TSOUTSOUKI, J. et al. Kisspeptin in the Prediction of Pregnancy Complications. **Frontiers**
2854 **in Endocrinology**, v. 13, n. July, p. 1–12, 19 jul. 2022.
- 2855 USHIDA, T. et al. Aberrant inflammation in rat pregnancy leads to cardiometabolic
2856 alterations in the offspring and intrauterine growth restriction in the F2 generation. **Journal of**
2857 **Developmental Origins of Health and Disease**, v. 13, n. 6, p. 706–718, 2022.
- 2858 VADLAKONDA, L. et al. The paradox of Akt-mTOR interactions. **Frontiers in Oncology**,
2859 v. 3 JUN, n. June, p. 1–9, 2013.
- 2860 VANDANMAGSAR, B. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced
2861 inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 179–189, 9 fev. 2011.
- 2862 VELASCO, I. et al. Gonadal hormone-dependent vs. -independent effects of kisspeptin
2863 signaling in the control of body weight and metabolic homeostasis. **Metabolism: Clinical**
2864 **and Experimental**, v. 98, p. 84–94, 2019.
- 2865 VERAS, M. M.; COSTA, N. S. X.; MAYHEW, T. **Best Practice for Quantifying the**
2866 **Microscopic Structure of Mouse Placenta**. [s.l.] Elsevier, 2014.
- 2867 VIKMAN, J.; AHRÉN, B. Inhibitory effect of kisspeptins on insulin secretion from isolated
2868 mouse islets. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, n. SUPPL. 4, p. 197–201, 2009.
- 2869 VILLALOBOS-LABRA, R. et al. Akt/mTOR Role in Human Foetoplacental Vascular Insulin
2870 Resistance in Diseases of Pregnancy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, 2017.
- 2871 WAHAB, F.; RIAZ, T.; SHAHAB, M. Study on the effect of peripheral Kisspeptin
2872 administration on basal and glucose-induced insulin secretion under fed and fasting
2873 conditions in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Hormone and Metabolic**
2874 **Research**, v. 43, n. 1, p. 37–42, 2011.
- 2875 WANG, F. et al. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer
2876 cells. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 9, p. 2101–2113, 2021a.
- 2877 WANG, J. et al. Association of thyroid function during pregnancy with the risk of
2878 preeclampsia and gestational diabetes mellitus. **Endocrine Practice**, 23 jun. 2021b.
- 2879 WHITLEY, G. S. J.; CARTWRIGHT, J. E. Cellular and Molecular Regulation of Spiral
2880 Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. **Placenta**, v. 31, n. 6, p. 465–
2881 474, jun. 2010.
- 2882 WHO. **Noncommunicable diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 31 mar. 2023.
- 2884 WINTERHAGER, E.; GELLHAUS, A. Transplacental Nutrient Transport Mechanisms of
2885 Intrauterine Growth Restriction in Rodent Models and Humans. **Frontiers in Physiology**, v.
2886 8, 27 nov. 2017.
- 2887 WU, H. M. et al. Kisspeptin regulation of human decidual stromal cells motility via FAK-Src
2888 intracellular tyrosine kinases. **Human Reproduction**, v. 34, n. 7, p. 1291–1301, 2019.
- 2889 XIE, Q. et al. The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal
2890 Axis and Reproduction. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, n. June, p. 1–16, 2022.

- 2891 XU, D.; ZHONG, H. Correlation Between Hypothyroidism During Pregnancy and Glucose
2892 and Lipid Metabolism in Pregnant Women and Its Influence on Pregnancy Outcome and Fetal
2893 Growth and Development. **Frontiers in Surgery**, v. 9, n. March, p. 1–6, 2022.
- 2894 XU, J. et al. Downregulation of placental amino acid transporter expression and mTORC1
2895 signaling activity contributes to fetal growth retardation in diabetic rats. **International**
2896 **Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020.
- 2897 YANG, L. et al. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Signal**
2898 **Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 255, 7 jul. 2021.
- 2899 YANG, Q.; VIJAYAKUMAR, A.; KAHN, B. B. Metabolites as regulators of insulin
2900 sensitivity and metabolism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 10, p. 654–
2901 672, 2018.
- 2902 YANG, Y. et al. Kisspeptin prevents pregnancy loss by modulating the immune
2903 microenvironment at the maternal-fetal interface in recurrent spontaneous abortion.
2904 **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 91, n. 2, p. 1–12, 2024.
- 2905 YAO, S.; LOPEZ-TELLO, J.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Developmental programming of
2906 the female reproductive system—a review. **Biology of Reproduction**, v. 104, n. 4, p. 745–
2907 770, 1 abr. 2021.
- 2908 YIN, L. et al. Crucial role of androgen receptor in resistance and endurance trainings-induced
2909 muscle hypertrophy through IGF-1/IGF-1R- PI3K/Akt- mTOR pathway. **Nutrition &**
2910 **Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 26, 30 dez. 2020.
- 2911 YOON, M. S. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in insulin signaling.
2912 **Nutrients**, v. 9, n. 11, 2017.
- 2913 YUAN, C. et al. Involvement of kisspeptin in androgen-induced hypothalamic endoplasmic
2914 reticulum stress and its rescuing effect in PCOS rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**
2915 **- Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, p. 166242, 2021.
- 2916 ZHANG, H. et al. Elevated expression of KiSS-1 in placenta of preeclampsia and its effect on
2917 trophoblast. **Reproductive Biology**, v. 11, n. 2, p. 99–115, jul. 2011.
- 2918 ZHANG, P. et al. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PLoS**
2919 **ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–8, 15 maio 2014.
- 2920 ZHANG, S. et al. Role of kisspeptin in decidualization and unexplained recurrent
2921 spontaneous abortion via the ERK1/2 signalling pathway. **Placenta**, v. 133, n. January, p. 1–
2922 9, 2023.
- 2923 ZIYARAA, M. A.; HAMDAN, F. B.; MOUSA, L. R. Correlation of Kisspeptin-10 level and
2924 fetal well-being in preeclamptic patients. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**,
2925 v. 55, n. 6, p. 840–846, 1 dez. 2016.
- 2926

2927

APENDICE A - CONTROLES NEGATIVO DO CAPÍTULO 1



2928