

Efeito do hipotireoidismo materno na expressão espaço-temporal de mediadores imunológicos e população de células natural killers na decídua e na glândula metrial de ratas

[Effect of maternal hypothyroidism on the spatiotemporal expression of immunological mediators and population of Natural Killers cells in decidua and metrial gland of rats]

C.A. Souza¹, J.F. Silva², N.M. Ocarino¹, C.L.R. Silva¹, L.A. Gomes¹, G.S.M. Assunção¹, C.M.O. Silva¹, K.P. Oliveira¹, R. Serakides^{1*}

¹Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

²Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus, BA

C.A. Souza:
<https://orcid.org/0000-0002-7965-4642>
J.F. Silva:
<https://orcid.org/0000-0002-9881-1236>
N.M. Ocarino:
<https://orcid.org/0000-0002-9542-4759>
C.L.R. Silva:
<https://orcid.org/0000-0001-5708-0206>
L.A. Gomes:
<https://orcid.org/0000-0002-0616-3092>
G.S.M. Assunção:
<https://orcid.org/0000-0003-0320-8918>
C.M.O. Silva:
<https://orcid.org/0000-0002-7402-596X>
K.P. Oliveira:
<https://orcid.org/0000-0003-4380-8037>
R. Serakides:
<https://orcid.org/0000-0001-5374-6242>

RESUMO

Estudou-se o efeito do hipotireoidismo materno na expressão espaço-temporal de mediadores imunológicos e na população de células *natural killers* (NK) na decídua e na glândula metrial de ratas durante a gestação. Avaliou-se a detecção imunoistoquímica de interferon γ (IFN γ), do fator inibidor de migração (MIF), da interleucina 15 (IL15), do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a marcação com lectina DBA para evidenciar as células NK uterinas DBA⁺ e a expressão gênica de *Ifny* e *Nos2*. O hipotireoidismo aumentou o iNOS aos sete dias, a IL15 e o MIF aos 10 e 12 dias, o IFN γ e o MIF aos 14 DG e a expressão dos transcritos gênicos para *iNos* aos 12 e 19 dias e para *Ifny* aos 14 DG. O hipotireoidismo reduziu a imunomarcagem de MIF e lectina DBA aos sete dias, lectina DBA aos 10 e 14 DG, IFN γ aos 12 dias, e a expressão de *Ifny* aos 10 e 19 DG e de iNOS aos 12, 14 e 19 DG, bem como reduziu seus transcritos gênicos aos 10 e 14 DG. Conclui-se que o hipotireoidismo compromete o perfil imunológico na interface materno-fetal ao longo da gestação, particularmente por reduzir o fator anti-inflamatório iNOS e a população de células uNK DBA⁺.

Palavras-chave: hipotireoidismo, decídua, glândula metrial, imunologia

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the effect of maternal hypothyroidism on the spatiotemporal expression of immunological mediators and population of Natural Killers cells in decidua and metrial gland of rats. Interferon gamma (IFN γ), migration inhibitory factor (MIF), interleukin 15 (IL15), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and DBA-Lectin labeling for evidence of uNK DBA⁺ cells in decidua and genetic expression of *Ifny* and *iNos* by real-time RT-PCR were evaluated. Hypothyroidism increased protein expression of iNOS at 7 days, IL15 and MIF at 10 and 12 days, IFN γ and MIF at 14 DG in the decidua and/or metrial gland and the gene transcripts for iNOS at 12 and 19 days and for *Ifny* at 14 DG. In addition, hypothyroidism reduced the protein expression of MIF and DBA-Lectin at 7 days, DBA-Lectin at 10 and 14 DG, IFN γ at 12 days, and the gene transcript to *Ifny* at 10 and 19 DGs. Hypothyroidism also reduced the protein expression of iNOS at 12, 14 and 19 DG and reduced its gene transcripts at 10 and 14 DGs. It is concluded that hypothyroidism compromises the immunology profile at the maternal-fetal interface throughout pregnancy, particularly by reducing the anti-inflammatory factor iNOS and population of uNK DBA⁺ cells.

Keywords: hypothyroidism, decidua, metrial gland, immunology

INTRODUÇÃO

Na gestação, o processo de decidualização é crucial no estabelecimento da interface materno-fetal. Isso porque a decídua promove a troca seletiva de nutrientes e metabólitos entre a mãe e

o feto (Plaisier, 2011; Cha *et al.*, 2012) e fornece um ambiente imunológico que permite a permanência do embrião/feto semialogênico em íntimo contato com o útero (Gellersen *et al.*, 2007; Reynolds *et al.*, 2010). Portanto, para o sucesso da gestação, é fundamental que haja uma interação fisiologicamente coordenada entre a placenta e o útero (Collins *et al.*, 2009), que será orquestrada por hormônios, entre os quais os

Recebido em 27 de março de 2018

Aceito em 12 de março de 2019

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: serakidesufmg@gmail.com

hormônios tireoidianos (Kilby *et al.*, 2005; Twig *et al.*, 2012). Alterações séricas desses hormônios durante a gestação têm resultado em aborto, natimortalidade e restrição do crescimento intrauterino tanto na mulher como nas espécies de animais domésticos (Zhang *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2012).

Durante a decidualização em roedores, as células *natural killers* uterinas (uNKs) se infiltram no endométrio, a partir do sétimo e oitavo dias de gestação, para coordenar o remodelamento vascular e influenciar o perfil imunológico na interface materno-fetal (Picut *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Essas células são um tipo de leucócito, com características morfológicas e bioquímicas específicas, que sintetizam uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2003). O recrutamento, a maturação e a diferenciação dessas células são dependentes da síntese de IFN γ , IL15 e MIF, entre outras. Essas citocinas pró-inflamatórias são sintetizadas por vários tipos celulares presentes na decídua, inclusive pelas próprias uNKs, e desempenham papel importante na resposta imune inata e adaptativa na interface materno-fetal (Ashkar *et al.*, 2000; Ashkar *et al.*, 2003).

O IFN γ estimula a atividade fagocitária dos macrófagos e das células gigantes trofoblásticas contra microrganismos (Ashkar *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2014). A IL15 altera o fenótipo das células NK do interstício uterino e do sangue para o fenótipo das uNKs que estão presentes no endométrio durante a gestação (Kitaya *et al.*, 2003a,b). Além disso, a IL15 aumenta as atividades proliferativa e citolítica das uNKs *in vitro* (Ye *et al.*, 1996). O MIF estimula a expressão de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), o IFN γ , a IL2, a IL6 e a IL8 (Faria *et al.*, 2010), bem como estimula a angiogênese; a proliferação celular suprime a apoptose (Arcuri *et al.*, 2006; Viganò *et al.*, 2007) e reduz a capacidade citolítica das uNKs (Arcuri *et al.*, 2006), antagonizando, portanto, a IL15. Cartwright *et al.* (1999) demonstraram que a motilidade e a invasão das células trofoblásticas na decídua são altamente dependentes do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) sintetizado pelos trofoblastos *in vitro*, uma citocina anti-inflamatória.

Ratas com hipotireoidismo apresentam redução da expressão de IFN γ e TNF α pelas células trofoblásticas dependendo do período gestacional (Silva *et al.*, 2014), enquanto mulheres com hipotireoidismo têm redução da expressão de IL4 e IL10, citocinas anti-inflamatórias, pelas células decíduais (Twig *et al.*, 2012). É importante ressaltar que alteração na população e na atividade citolítica das uNKs no endométrio de mulheres gestantes está associada a complicações gestacionais, como aborto e restrição do crescimento intrauterino (Ashkar *et al.*, 2003) e é modulada pela IL15 (Ye *et al.*, 1996). Além disso, camundongos que não possuem células uNKs são férteis, mas exibem remodelamento vascular uterino inadequado, pobre decidualização e baixo peso fetal (Colucci *et al.*, 2011). Pesquisas já demonstraram que o hipotireoidismo compromete o ambiente anti-inflamatório do disco placentário por reduzir a expressão de IL10 e iNOS (Silva *et al.*, 2014). Contudo, ainda não há nenhuma evidência se na decídua de animais com hipotireoidismo ocorre o mesmo efeito. O que se sabe é que a síntese *in vitro* de citocinas inflamatórias pelas células decíduais humanas é responsiva à triiodotironina (T₃) (Vasilopoulou *et al.*, 2014).

Apesar das pesquisas que investigaram os efeitos das disfunções tireoidianas no disco placentário de ratas (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015), a população de células uNKs e a expressão de fatores imunológicos na decídua de animais com hipotireoidismo não têm sido estudadas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do hipotireoidismo na detecção imunistoquímica das citocinas IFN γ , IL15, iNOS, MIF e da lectina DBA para avaliação das células uNK e da expressão de transcritos gênicos para *Ifny* e *iNos* na decídua e na glândula metrial de ratas ao longo da gestação.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº. 268/2011). Foram utilizadas 72 ratas Wistar, com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (seis animais/caixa), onde receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram

mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após um período de 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em dois grupos: hipotireoideo e controle, sendo cada grupo com 36 animais. O grupo hipotireoideo recebeu diariamente, por sonda orogástrica, durante cinco dias, 1mg/animal de 6-propil-2-tiouracil (Silva *et al.*, 2012), diluído em 5mL de água destilada. Os animais do grupo controle receberam água destilada como placebo.

Após cinco dias do início do tratamento, as fêmeas de ambos os grupos foram submetidas à citologia vaginal para acompanhamento do ciclo estral. Nesse mesmo período, seis ratas de cada grupo foram eutanasiadas com sobredose de anestésico para coleta de sangue e dosagem de T₃ e T₄ livre para confirmação da indução do hipotireoidismo. As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas. Após esse período, esfregaços vaginais foram realizados diariamente no início da manhã, a fim de se detectar a presença de espermatozoides, o que confirmava a cópula, e esse dia era designado como dia 0 de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais dos grupos hipotireoideo e controle continuaram com o tratamento, como descrito acima, até a eutanásia.

No dia 0 e aos 19 dias de gestação, seis ratas de cada grupo foram anestesiadas com cloridrato de xilazina a 2% (Laboratórios König, Avellaneda – Argentina (5mg/kg, intramuscular) e quetamina injetável Vetnil – 10mg/mL – (Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários Ltda. – Louveira – SP, Brasil) (50mg/kg, intramuscular), para coleta de sangue por punção intracárdica. O sangue foi coletado em tubos com heparina para obtenção do plasma, e este armazenado a -20°C para posterior dosagem de tri-iodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) livre. A dosagem foi realizada pela técnica de quimioluminescência (Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA), em sistema totalmente automático e de acordo com as recomendações do fabricante dos *kits*.

Nos dias sete, 10, 12, 14 e 19 de gestação (DG), seis ratas de cada grupo foram eutanasiadas com sobredose de anestésico. Após a eutanásia, o útero contendo a placenta e os fetos foram separados da tuba e dos ovários. Foram retirados aleatoriamente cinco sítios de inserção

placentária por rata. Os sítios foram dissecados, e a decídua juntamente com as membranas fetais foram coletadas. As decíduas de três sítios de inserção placentária por rata foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Em seguida, foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e submetidas à microtomia para obtenção de secções de 4µm. As secções foram coradas pela hematoxilina-eosina e submetidas à imunistoquímica para avaliação da expressão de IFN γ , iNOS, MIF, IL15 e lectina DBA. Para a realização do RT-PCR em tempo real para os genes *Ifny* e *iNos*, foi coletada somente a região de decídua, juntamente com a glândula metrial de dois sítios da interface materno-fetal por animal, nos períodos de 10, 12, 14 e 19 DG. As amostras foram mergulhadas imediatamente em TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C, por no máximo duas semanas, até a análise.

Foram utilizados os anticorpos anti-IFN γ (1:200) (AB9657, Abcam, Cambridge, UK), anti-iNOS (1:100) (AB15323, Abcam, Cambridge, UK), anti-MIF (1:500) (AB7207, Abcam, Cambridge, UK), anti-IL15 (1:300) (AF447, RD System, Minneapolis, USA) e antilectina DBA (1:300) (L6533-5MG, Sigma, Saint Louis, USA). A técnica realizada foi a da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Dako LSAB+ System-HRP, Carpinteira, CA, USA), e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C, utilizando-se tampão citrato (2,1g de ácido cítrico em 1L de água destilada, ajustando-se o pH em 6,0 com NaOH a 0,5%). As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Dako Protein Block Serum-Free Ready-To-Use, Carpinteira, CA, USA) e estreptavidina peroxidase. Os anticorpos primários anti-IFN γ , anti-iNOS, anti-MIF, anti-IL15 e antilectina DBA foram incubados *overnight*. A incubação com anticorpo secundário foi realizada por 45 minutos. O cromógeno foi a diaminobenzidina (Dako DAB Substrate Chromogen System, Carpinteira, CA, USA). As secções foram contracoradas com hematoxilina. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por soro bloqueio.

Foi realizada uma avaliação descritiva e quantitativa da detecção imunoistoquímica de IFN γ , MIF, iNOS, IL15 e lectina DBA nas camadas de decídua mesometrial e antimesometrial aos sete DG, na decídua mesometrial aos 10 DG e na decídua basal e na glândula metrial aos 12, 14 e 19 DG, adjacente ao sítio de inserção placentária. A avaliação quantitativa foi realizada em três sítios de inserção placentária/rata. Uma secção histológica/sítio de inserção placentária foi feita transversalmente, sempre no mesmo ponto, incluindo a decídua e a glândula metrial com seus vasos sanguíneos e o disco placentário, para padronização do local de análise. Para determinar a área de imunomarcção, imagens foram fotografadas com a câmera digital Spot Color Insight (SPOTTM, Sterling Heights, Michigan, USA) acoplada a um microscópio Olympus BX-40. A área de imunomarcção foi determinada pelo WCIF ImageJ[®] (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA). *Color deconvolution* e *thresholding* das imagens foram feitos. Os dados de cada decídua foram arquivados, analisados e expressos como área de imunomarcção em *pixels*.

O mRNA total da região da decídua e da glândula metrial foi extraído usando-se o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Um total de 1 μ g de RNA foi utilizado para a

síntese de cDNA, utilizando-se o *kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As reações foram realizadas em um termociclador *Smart Cycler II* (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA).

Realizou-se PCR em tempo real com *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) no *AB The Applied Biosystems[™] ViiA[™] 7 system* (*Applied Biosystems, Life Technologies*). Para os controles negativos, utilizou-se o *mix* de amplificação de DNA completo, e a amostra contendo o cDNA-alvo foi substituída por água. As amplificações foram realizadas utilizando-se as condições de ciclagem padrão: ativação da enzima a 95°C durante 10min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15s e pareamento dos *primers*/extensão a 60°C durante 60s. Para avaliar a linearidade e a eficiência da amplificação por PCR, foram geradas curvas-padrão para todos os transcritos, utilizando-se diluições em série de cDNA. A curva de fusão foi obtida para os produtos de amplificação para determinar as suas temperaturas de fusão. A expressão gênica foi calculada usando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que os valores das amostras foram calculados e calibrados em relação aos valores do CT de *β -actina*. Os *primers* estão listados na Tab. 1. Todas as análises foram realizadas nas regiões de decídua mais glândula metrial aos 10, 12, 14 e 19 DG.

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos *primers* para RT-PCR em tempo real

Genes	Primers	Número de acesso
<i>Ifnγ</i>	Forward 5'- AGTGCTACACGCCGCGTCTT -3'	NM_138880.2
	Reverse 5'- AGTGTGCCTTGGCAGTAACAGCC -3'	
<i>iNos</i>	Forward 5'- TGGTCCTGCAGGCTCACGGT -3',	NM_012611.3
	Reverse 5'- ACTCGAGGCCACCCACCTCC -3'	
<i>β-actina</i>	Forward 5'- TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT-3'	NM_031144.2
	Reverse 5'- CGACGAGCGCAGCGATATCGT -3'	

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com fatorial 2x5 (dois grupos, cinco períodos), para as análises imunoistoquímicas e fatorial 2x4 (dois grupos, quatro períodos), para o RT-PCR em tempo real. A ANOVA foi realizada e, para cada variável, foi determinada a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste SNK. Diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

RESULTADOS

A indução do hipotireoidismo durante todo o período gestacional foi confirmada pela concentração plasmática de T₃ e T₄ livre nos dias 0 e 19 de gestação e pela sintomatologia apresentada pelos animais. As ratas tratadas com PTU apresentaram concentrações menores de T₃ (Tab. 2) e T₄ (Tab. 3) livres em relação às do grupo controle (Tab. 2 e 3) e sinais clínicos de letargia e alopecia.

Efeito do hipotireoidismo...

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de T₃ livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle e hipotireoideio aos 0 e 19 dias de gestação

Período	Controle	Hipotireoideio
Dia 0	2,345 ±0,289 a	1,856 ±0,188 b
19 dias	1,757 ±0,281 a	1,180 ±0,155 b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P< 0,05)

Tabela 3. Concentrações plasmáticas de T₄ livre (média±DP) nas ratas gestantes dos grupos controle e hipotireoideio aos 0 e 19 dias de gestação

Período	Controle	Hipotireoideio
Dia 0	1,196 ±0,123 a	0,437 ±0,095 b
19 dias	0,795 ±0,173 a	0,104 ±0,080 b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P< 0,05)

As regiões de decídua mostraram detecção de IFN γ (Fig. 1), IL15 (Fig. 2), iNOS (Fig. 3), MIF (Fig. 4) e lectina DBA (Fig. 5) nas camadas de decídua mesometrial e antimesometrial, aos sete DG, na decídua mesometrial, aos 10 DG, e na decídua basal e na glândula metrial, aos 12, 14 e 19 DG. A detecção imunistoquímica de IFN γ , IL15 e MIF foi nuclear e/ou citoplasmática, ao contrário da expressão do iNOS e da lectina

DBA, que foi apenas citoplasmática. Independentemente do grupo, a detecção máxima de IFN γ (Fig. 1F), IL15 (Fig. 2F) e iNOS (Fig. 3F) ocorreu aos 12 DG, em comparação aos demais períodos de gestação. Já o MIF e a lectina DBA não tiveram um padrão de expressão bem definido entre os períodos e não apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos avaliados (Fig. 4F e 5F).

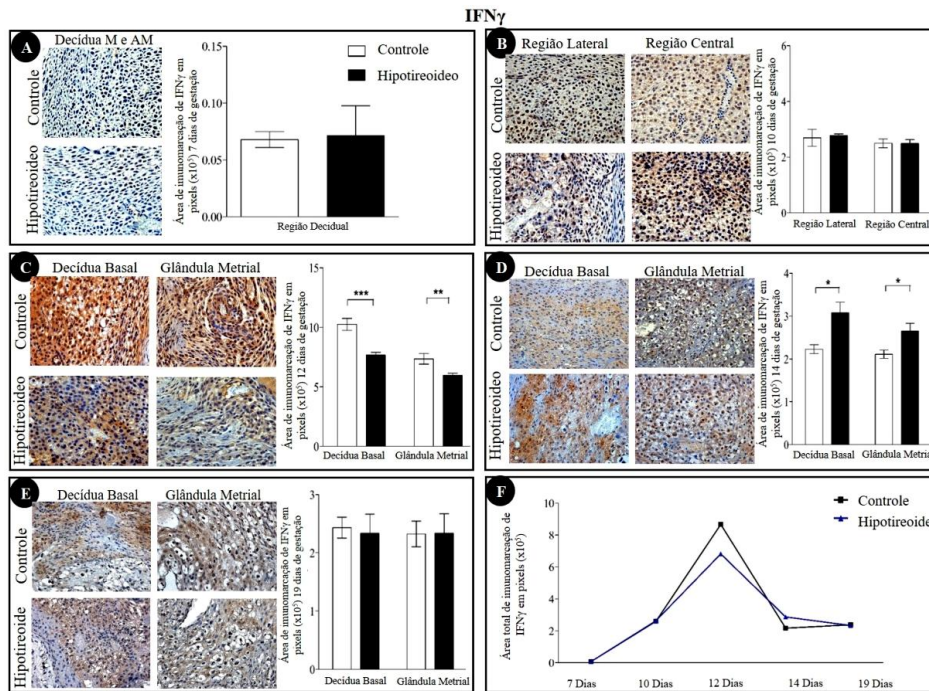


Figura 1. Detecção imunistoquímica de IFN γ na decídua de ratas dos grupos controle e hipotireoideio. (A) Decídua aos sete dias de gestação (DG) sem diferença entre os grupos tratado e controle. (B) Decídua aos 10 DG sem diferença significativa entre os grupos tratado e controle. (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG com redução da área de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com aumento da área de imunomarcção em ambas as áreas avaliadas. (E) Detecção imunistoquímica de IFN γ na decídua basal na glândula metrial aos 19 DG sem diferença significativa entre os grupos controle e hipotireoideio. (F) Perfil de imunomarcção de IFN γ na decídua de ratas ao longo da gestação em cada grupo. Aos 12 DG, houve um pico da imunomarcção para IL15 em relação aos demais períodos analisados (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

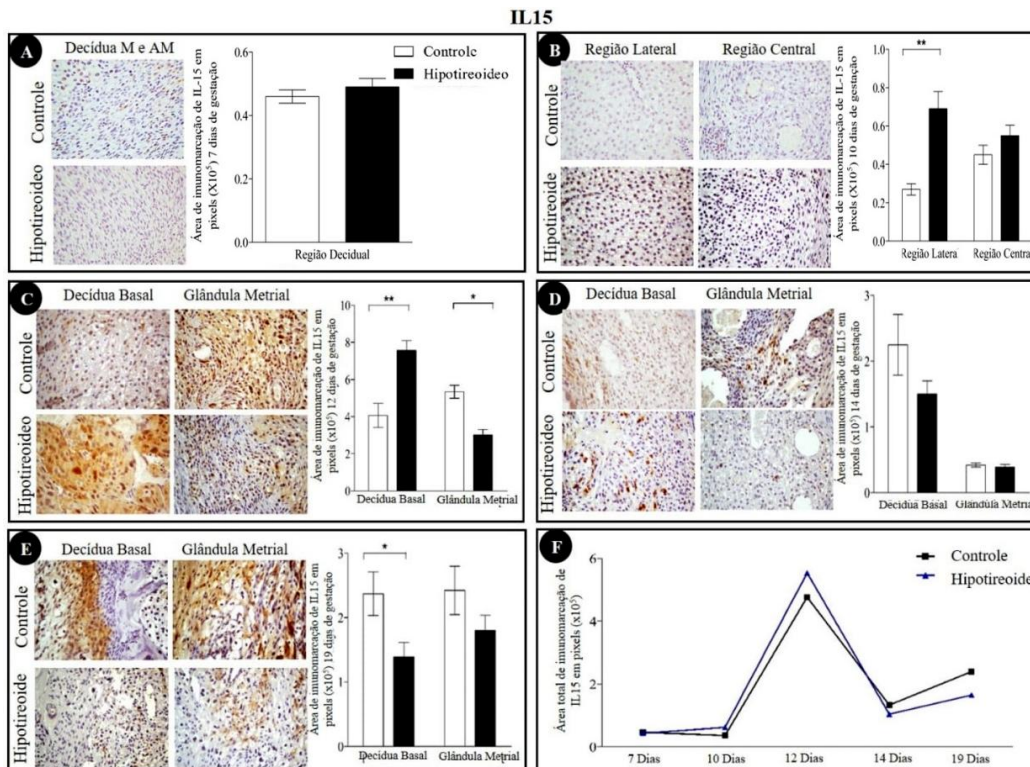


Figura 2. Detecção imunistoquímica de IL15 na decídua de ratos dos grupos controle e hipotireoideo. (A) Decídua aos sete DG sem diferença entre os grupos controle e hipotireoideo. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área de imunomarcacão do grupo hipotireoideo na região lateral. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redução da área de imunomarcacão na glândula metrial e aumento na decídua basal do grupo hipotireoideo em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com redução da área de imunomarcacão na região de glândula metrial. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redução da área de imunomarcacão na região de decídua basal do grupo hipotireoideo em relação ao controle. (F) Perfil de imunomarcacão de IL15 na decídua de ratos ao longo da gestação em cada grupo. Aos 12 DG, houve um pico da imunomarcacão para IL15 em relação aos demais períodos analisados. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Aos 12 DG, houve redução da imunomarcacão de IFN γ no grupo hipotireoideo ($P < 0,01$) (Fig. 1C) em relação ao controle. Ao contrário, aos 14 DG, houve aumento da área de imunomarcacão de IFN γ em relação ao controle na decídua basal e na glândula metrial (Fig. 1D). Aos 10 DG, houve aumento da área de imunomarcacão para IL15 na região lateral no grupo hipotireoideo em comparacão ao controle (Fig. 2B; $P < 0,01$). Aos 12 dias, o aumento da área de imunomarcacão se manteve no grupo hipotireoideo na região da decídua basal (Fig. 2C; $P < 0,01$). Contudo, na região da glândula metrial, houve redução no grupo hipotireoideo ($P < 0,01$) (Fig. 2C). Apesar dessa redução, foi observado o pico de expressão de IL15 aos 12 DG tendo sido estatisticamente diferente dos demais períodos analisados (Fig. 2F). Aos 19 DG, entretanto, houve redução da área de imunomarcacão para IL15 na região de

decídua basal no grupo hipotireoideo ($P < 0,05$) (Fig. 2E).

Com relação à imunomarcacão para o óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aos sete DG, observou-se aumento da área de imunomarcacão na região de decídua no grupo hipotireoideo (Fig. 3A; $P < 0,05$). Já aos 12 DG, na decídua basal e na glândula metrial, houve redução no grupo hipotireoideo da área de imunomarcacão de iNOS em relação ao controle (Fig. 3C; $P < 0,05$). Apesar dessa redução, foi observado o pico de expressão de iNOS aos 12 DG tendo sido estatisticamente diferente dos demais períodos analisados (Fig. 3F), como ocorreu na IL15 e no IFN γ . Aos 14 e 19 DG, a redução da área de imunomarcacão de iNOS no grupo hipotireoideo manteve-se na glândula metrial (Fig. 3D; 3E; $P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Efeito do hipotireoidismo...

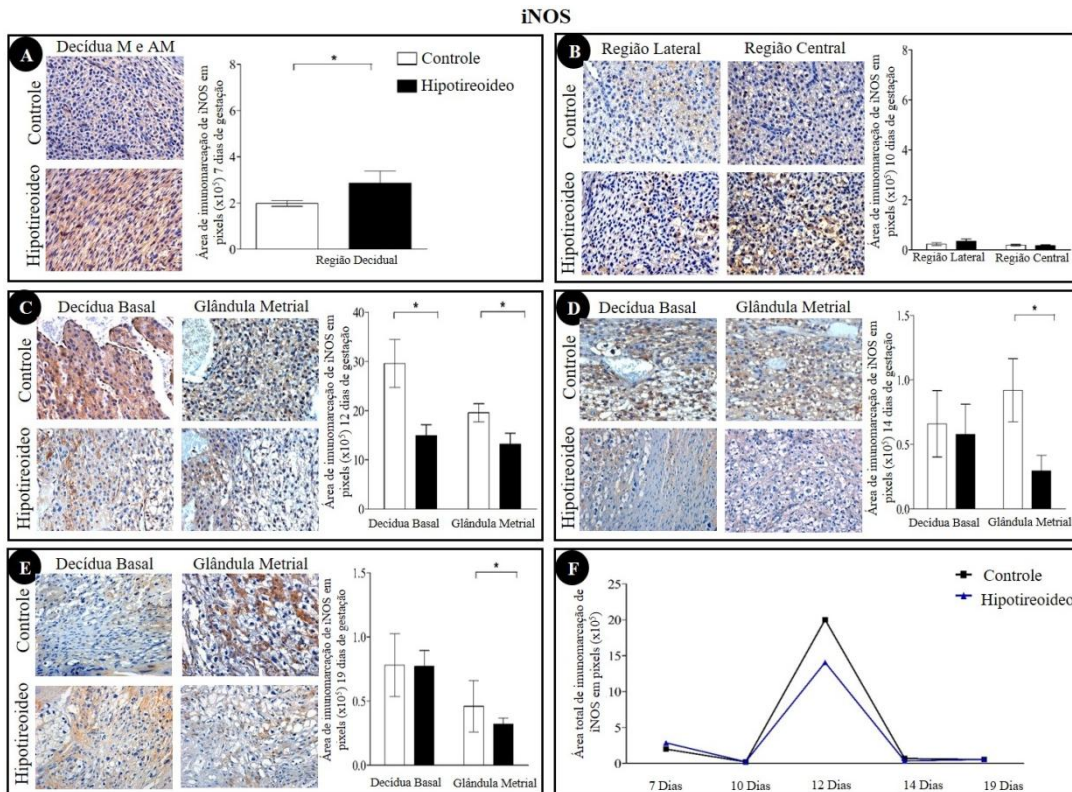


Figura 3. Detec o imunistoquímica de iNOS na decídua e na glândula metrial de ratas dos grupos controle e hipotireoide. (A) Decídua aos sete DG com aumento da área de imunomarca o de iNOS na região da decídua mesometrial e antimesometrial no grupo hipotireoide em compara o com o grupo controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG sem diferença significativa entre os grupos hipotireoide e controle. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com redu o da área de imunomarca o na decídua basal e na glândula metrial do grupo hipotireoide em rela o ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG, com redu o da área de imunomarca o na região de glândula metrial do grupo hipotireoide em rela o ao controle. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG com redu o da área de imunomarca o na região da glândula metrial do grupo hipotireoide em rela o ao controle. (F) Perfil de imunomarca o de iNOS na decídua de ratas ao longo da gesta o em cada grupo. Aos 12 DG, houve um pico da imunomarca o para IL15 em rela o aos demais períodos analisados (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

A  rea de imunomarca o para o MIF reduziu-se intensamente no grupo hipotireoide aos sete DG em rela o ao controle (Fig. 4A; $P < 0,001$). Aos 10 DG, o grupo hipotireoide apresentou aumento da imunomarca o para MIF (Fig. 4B). Aos 12 DG, na decídua basal, houve aumento da imunomarca o de MIF no grupo hipotireoide (Fig. 4C; $P < 0,01$) em rela o ao controle, mas sem diferença na região da glândula metrial ($P > 0,05$). Aos 14 dias, na decídua basal e na

glândula metrial, observou-se aumento de MIF no grupo hipotireoide (Fig. 4D; $P < 0,05$) em rela o ao controle. Aos 19 DG, não foram observadas diferenças significativas entre grupos (Fig. 4E). Ainda com rela o   expressão de MIF, observou-se que a flutua o da expressão de MIF, observou-se que a flutua o da expressão de MIF ao longo da gesta o não seguiu um padrão, com um pico de expressão, como nas marca es pelos $IFN\gamma$, IL15 e iNOS (Fig. 4F).

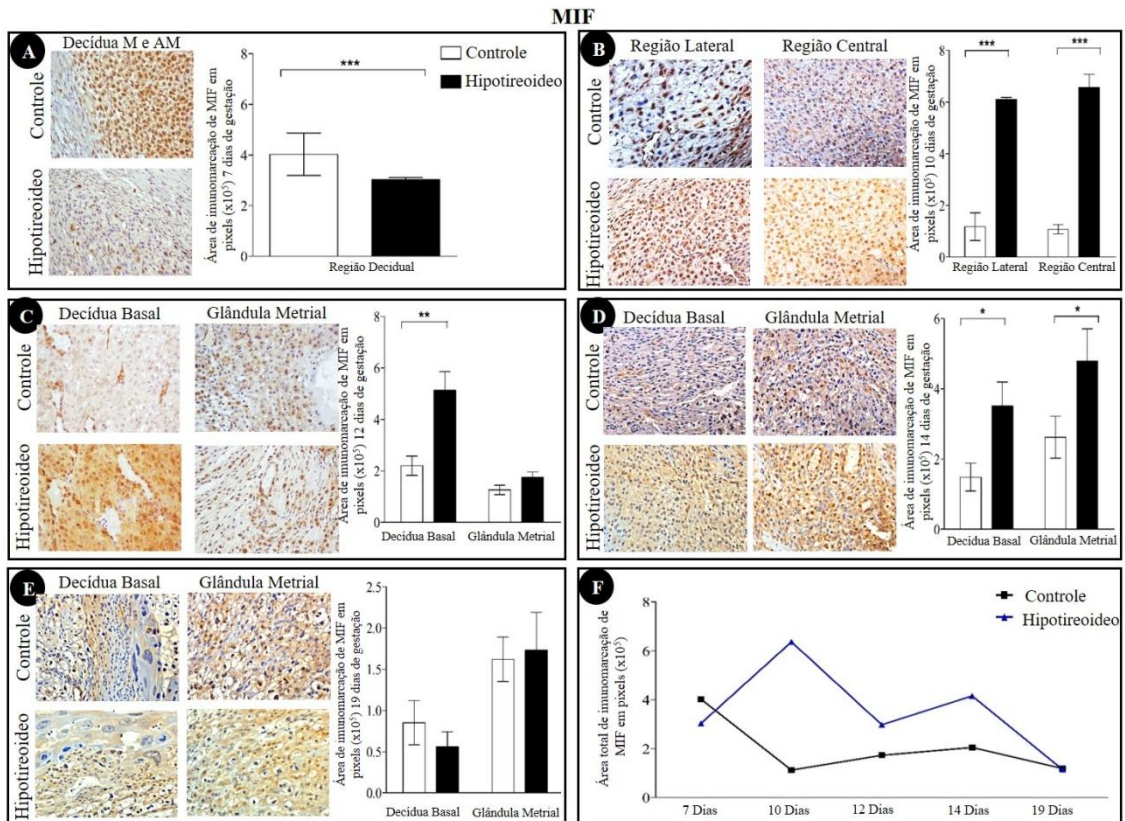


Figura 4. Detecção imunohistoquímica de MIF na decídua e na glândula metrial de ratas dos grupos controle e hipotireoideo. (A) Decídua aos sete DG com redução da área de imunomarcagem de MIF na região da decídua mesometrial e antimesometrial do grupo hipotireoideo em relação ao controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com aumento da área de imunomarcagem nas regiões lateral e central do grupo hipotireoideo. (C) Decídua e glândula metrial aos 12 DG com aumento da área de imunomarcagem na decídua basal no grupo hipotireoideo em relação ao controle. (D) Decídua e glândula metrial aos 14 DG com aumento, da área de imunomarcagem, na região de decídua basal e na glândula metrial do grupo hipotireoideo, em relação ao controle. (E) Decídua e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos. (F) Perfil de imunomarcagem de MIF na decídua de ratas ao longo da gestação em cada grupo (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

A imunomarcagem para lectina DBA aos sete DG reduziu-se no grupo hipotireoideo em relação ao controle ($P < 0,001$) (Fig. 5A). Aos 10 DG, na região lateral, também houve redução da imunomarcagem neste grupo para as células uNK DBA⁺ (Fig. 5B), sendo sua presença mais evidente na região central, onde há a presença da arteríola espiralada central. Nessa região, as células uNK apresentavam-se ora volumosas, ora semelhantes a linfócitos com escasso citoplasma. Nesse período da gestação, as células decíduais também expressaram lectina DBA. A expressão de lectina DBA nas células uNK foi diferenciada, forte e junto à membrana nuclear. Nesse período, foi possível visualizar as células uNKs

infiltrando-se na glândula metrial e dispondo-se concêntricamente ao redor dos vasos sanguíneos. Esse padrão concêntrico torna-se mais evidente aos 12 e 14 DG. Aos 14 DG, observou-se redução da área ($P < 0,01$) de imunomarcagem para lectina DBA no grupo hipotireoideo somente na região de decídua basal (Fig. 5D). Aos 19 DG, a marcação torna-se mais fraca e as células têm aspecto mais vacuolizado, caracterizando o processo degenerativo que ocorre comumente ao final da gestação. Nesse período, não houve diferença de imunomarcagem entre os grupos (Fig. 5E).

Efeito do hipotireoidismo...

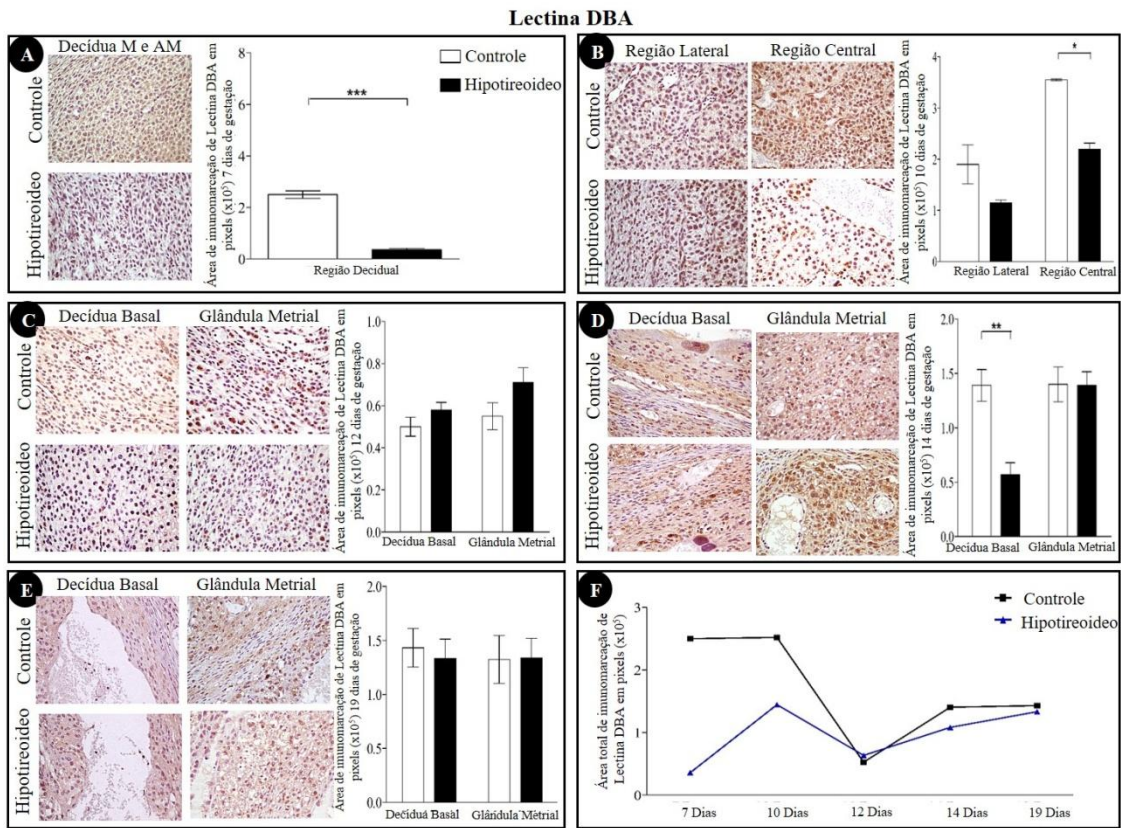


Figura 5. Detecção imunoistoquímica de lectina DBA na decídua e na glândula metrial de ratas dos grupos controle e hipotireoideo. (A) Decídua mesometrial e antimesometrial aos sete DG com redução da área de imunomarcção de lectina DBA na região da decídua mesometrial e antimesometrial do grupo hipotireoideo em relação ao controle. (B) Decídua mesometrial aos 10 DG com redução da área de imunomarcção na região central e na glândula metrial do grupo hipotireoideo. (C) Decídua basal e glândula metrial aos 12 DG sem diferença entre os grupos. (D) Decídua basal e glândula metrial aos 14 DG com redução da área de imunomarcção na região de decídua basal no grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle. (E) Decídua basal e glândula metrial aos 19 DG sem diferenças significativas entre os grupos. (F) Perfil de imunomarcção de lectina DBA na decídua de ratas ao longo da gestação em cada grupo (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

Aos 10 DG, a expressão dos transcritos gênicos para *Ifnγ* (Fig. 6A; P<0,01) e *iNos* (Fig. 6B; P<0,01) reduziu-se no grupo hipotireoideo em relação ao controle. Aos 12 DG, a expressão gênica de *Nos2* aumentou no grupo hipotireoideo em comparação ao controle (Fig. 6B; P<0,001), diferentemente dos 14 DG, em que sua expressão reduziu-se (Fig. 6B; P<0,05). Em contrapartida,

o *Ifnγ* apresentou maior expressão gênica no grupo hipotireoideo em relação ao controle aos 14 DG (Fig. 6A; P<0,05). Aos 19 dias, o hipotireoidismo reduziu a expressão de *Ifnγ* (Fig. 6A; P<0,01) na decídua. Contudo, aumentou a expressão de *iNos* em relação ao controle (Fig. 6B; P<0,01).

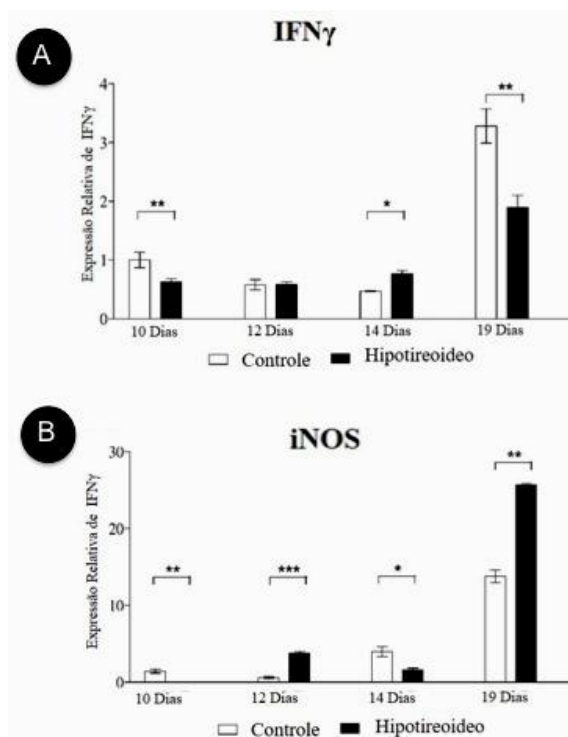


Figura 6. Expressão relativa gênica de IFN γ e iNOS na decídua de ratas dos grupos controle e hipotireoideo aos sete, 10, 12, 14 e 19 DG. (A) Expressão relativa de *Ifny* apresentando redução no grupo hipotireoideo aos 10 DG, aumento aos 14 DG e redução aos 19 DG em relação ao grupo controle. (B) Expressão relativa de *iNos* apresentando redução aos 10 DG, aumento aos 12 DG, redução aos 14 DG e aumento aos 19 DG do grupo hipotireoideo em relação ao controle (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

DISCUSSÃO

O hipotireoidismo materno alterou o perfil de expressão espaço-temporal dos fatores imunológicos na decídua e na glândula metrial de ratas ao longo da gestação. Embora a resposta tenha sido variável dentro do grupo, dependendo da região e do período analisados, a redução do fator anti-inflamatório iNOS e da marcação de células uNKs DBA⁺ foi evidente no grupo hipotireoideo, o que pode comprometer não somente o desenvolvimento de um ambiente anti-inflamatório na interface materno-fetal como também o remodelamento arterial intrauterino pelas células trofoblásticas. É pertinente destacar que efeitos semelhantes foram observados no disco placentário de ratas com hipotireoidismo materno (Silva *et al.*, 2014).

Aos sete DG, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem de iNOS e reduziu a imunomarcagem de MIF e a população de células

uNK DBA⁺. O iNOS tem efeitos anti-inflamatórios, e o seu aumento na interface materno-fetal está associado ao estresse oxidativo (Leanza *et al.*, 2007). É importante ressaltar que, nesse período gestacional, é necessário um ambiente pró-inflamatório que permita o processo de implantação embrionária e migração trofoblástica (Koga *et al.*, 2009), sendo que o aumento da expressão de iNOS observado nos animais hipotireoideos, nesse período gestacional, pode comprometer tais processos. Além disso, a menor expressão de lectina DBA nos animais hipotireoideos sugere menor número ou diferenciação de células uNKs. Esse achado pode tanto desfavorecer o perfil imunológico da interface materno-fetal quanto prejudicar o remodelamento vascular, uma vez que as células uNKs estão envolvidas nesse processo (Plaisier, 2011). O MIF é uma citocina multifuncional que tem sido relacionada, na interface materno-fetal, à angiogênese, à proliferação celular (Viganò *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2010), à supressão da apoptose e ao aumento na síntese proteica (Faria *et al.*, 2010). Dessa forma, a redução da imunomarcagem de MIF na decídua dos animais hipotireoideos poderia explicar o retardo na diferenciação dos fibroblastos intersticiais em células deciduais, a ausência do estímulo trófico dos hormônios tireoidianos (Galton *et al.*, 2001) e a consequente redução da área da decídua aos 10 DG (Souza *et al.*, 2017).

Aos 10 DG, o hipotireoidismo aumentou a imunomarcagem de IL15 e MIF, mas reduziu a imunomarcagem das células uNK para lectina DBA, além de reduzir a expressão gênica de *Ifny* e *iNos*. Esses achados são semelhantes aos encontrados por Silva *et al.* (2014) no disco placentário. O IFN γ influencia diretamente a função das células uNKs que estão envolvidas tanto na imunidade quanto na dinâmica vascular placentária e decidual (Hu e Cross, 2010). Além disso, o IFN γ está relacionado à atividade fagocítica de macrófagos, importante para a diferenciação do trofoblasto durante o período de diferenciação do cone ectoplacentário (Leanza *et al.*, 2007). Portanto, a expressão reduzida de *Ifny* pode ter sido a causa do subdesenvolvimento da decídua observado por Souza *et al.* (2017) em animais com hipotireoidismo. O IFN γ sintetizado pelas células uNKs interfere na função imune decidual e modifica a expressão de genes pelas células endoteliais e estromais e pelos miócitos, favorecendo o início do remodelamento vascular

na decídua (Ashkar *et al.*, 2000; Hu e Cross, 2010). Mas a redução do IFN γ poderia implicar retardo do remodelamento vascular, prejudicando a vascularização decidual, e ser a causa do retardo da diferenciação dos fibroblastos intersticiais em células deciduais (Galton *et al.*, 2001). Esses fatos conjuntamente agravariam ainda mais o desenvolvimento da decídua e justificariam o baixo peso fetal e placentário apresentado por animais com hipotireoidismo materno (Silva *et al.*, 2012).

O aumento da IL15 na região lateral da decídua mesometrial dos animais hipotireoideos aos 10 DG pode ter ocorrido pelo fato de que é também observado, nesse mesmo período, o acúmulo de uNKs na região central de ratas gestantes, bem como sua diferenciação (Bilinsk *et al.*, 2008). Contudo, esse acúmulo de uNKs não foi observado no grupo hipotireoideo, uma vez que houve redução das uNKs DBA⁺. Existem subtipos de uNKs, algumas são DBA⁻ e outras são DBA⁺ (Zhang *et al.*, 2009). Tal fato pode ter ocorrido pelo aumento de células uNKs DBA⁻, que não foram avaliadas neste estudo. A IL15, além do seu papel pró-inflamatório, também promove a mudança no fenótipo das células NK para as células uNKs, que têm morfologia e funcionalidade peculiares durante a gestação (Kitaya *et al.*, 2003b). Contudo, a IL15 não só aumenta a proliferação e a diferenciação da uNK como também é responsável por aumentar a atividade citolítica dessas células (Clifford *et al.*, 1999). O aumento da expressão de IL15 acima do fisiológico poderia exacerbar a atividade citolítica da uNK, prejudicando os desenvolvimentos embrionário e fetal, e ser um dos fatores pelos quais se explica a redução da migração das células trofoblásticas na decídua de ratas com hipotireoidismo (Silva *et al.*, 2014).

Aos 12 DG, nos animais hipotireoideos, foi observada redução da imunomarcagem de IFN γ e iNOS e aumento de IL15, de MIF e da expressão gênica de *iNos*. Estudos anteriores demonstraram que o IFN γ , além de ativar macrófagos deciduais, na interface materno-fetal, também induz a síntese de iNOS pelos trofoblastos fetais (Hoshida *et al.*, 2007). A redução de imunomarcagem de iNOS em animais hipotireoideos foi observada aos 12, 14, e 19 DG e a redução da expressão gênica foi observada aos 10 DG. Contudo, houve períodos em que o seu aumento também foi observado no

hipotireoidismo, como aos sete DG, pela imunistoquímica, e aos 12 e 19 DG, na expressão dos transcritos gênicos. A diferença entre os resultados de RT-PCR e da imunistoquímica para o iNOS pode ser explicada pelo fato de que o primeiro teste reflete a expressão do transcrito gênico, enquanto o segundo permite avaliar a expressão da proteína. A redução do iNOS tem sido associada à pré-eclâmpsia e à restrição de crescimento intrauterino (Liao *et al.*, 1996). O tratamento de ratas gestantes com inibidor de iNOS resulta em sintomas semelhantes ao pré-eclâmpsia. Isso ocorre porque o iNOS promove o relaxamento muscular e, na sua ausência, haveria aumento da pressão dos vasos sanguíneos e da contração uterina (Liao *et al.*, 1996). Segundo Purcell *et al.* (1997), o iNOS presente na placenta de ratas está relacionado aos níveis de progesterona materno. Sabe-se que ratas com hipotireoidismo materno geralmente apresentam níveis elevados de progesterona (Hatsuta *et al.*, 2004), e esse fato pode ter favorecido a redução dos níveis de iNOS em praticamente todos os períodos gestacionais. Além disso, a progesterona é o hormônio com maior efeito na tensão vascular ao longo da gestação em ratas (Liao *et al.*, 1996). Outro fato interessante, que corrobora os achados do presente estudo, é que macrófagos de ratas sob influência de altas doses de progesterona apresentam redução da expressão de iNOS (Miller *et al.*, 1996).

Pesquisas anteriores realizadas pela equipe do presente trabalho demonstraram que, no disco placentário de ratas com hipotireoidismo materno, há redução de imunomarcagem de IFN γ aos 14 e 19 DG no espongiotrofoblasto e redução de transcritos gênicos aos 10 e 14 DG (Silva *et al.*, 2014). A redução da imunomarcagem de IFN γ nos animais hipotireoideos do presente trabalho aos 12 DG corrobora os resultados de Silva *et al.* (2014) e pode comprometer o desenvolvimento placentário e decidual. O IFN γ influencia diretamente a função das uNKs que estão envolvidas na função imune e na dinâmica vascular placentária e decidual (Ashkar *et al.*, 2000; Hu e Cross, 2010). Camundongos *knockout* para IFN γ e seu receptor ou sem leucócitos apresentam tecido decidual subdesenvolvido (Ashkar *et al.*, 2000). Esses indivíduos, quando tratados com IFN γ recombinante, podem ter um remodelamento vascular mais próximo do normal e um melhor

desenvolvimento decidual (Monk *et al.*, 2005). Outro fato que reforça essa afirmativa é que animais com hipotireoidismo apresentam intenso comprometimento vascular na placenta e redução do peso fetal (Silva *et al.*, 2012).

Aos 14 DG, tem-se o ponto máximo do desenvolvimento vascular da decídua e da glândula metrial (Picut *et al.*, 2009; Plasier, 2011). Nesse período foi observado, nos animais hipotireoideos, aumento da imunomarcagem de IFN γ , MIF e redução de iNOS e das células uNKs DBA⁺, além do aumento da expressão gênica de *Ifny* e redução do *Nos2*. O aumento do IFN γ é oposto ao resultado observado no disco placentário de ratas com hipotireoidismo no mesmo período gestacional, nas quais há redução de expressão gênica e proteica de IFN γ (Silva *et al.*, 2014). Esse fato poderia ser a explicação para abortos recorrentes em algumas mulheres com hipotireoidismo subclínico (Fontana *et al.*, 2010). Além disso, células trofoblásticas humanas cultivadas em meio com IFN γ têm o seu crescimento inibido e apresentam alterações degenerativas (Raghupathy, 1997).

Aos 19 DG, o hipotireoidismo resultou em redução de IL15, na decídua basal, de iNOS, na glândula metrial, e de transcritos gênicos para *Ifny* e aumento de *iNos*. Nesse período há regressão da decídua basal e da glândula metrial, com presença de células uNK degeneradas (Picut *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2017). Em condições normais, há aumento de iNOS ao longo da gestação e redução ao final (Dong *et al.*, 1998), como confirmado pelo presente trabalho. Entretanto, observou-se que o hipotireoidismo aumentou a transcrição gênica de *iNos*, que poderia aumentar posteriormente, mais próximo ao parto, a expressão proteica de iNOS, criando um ambiente anti-inflamatório e, dessa forma, provocar o atraso no parto observado em animais com hipotireoidismo (Hapon *et al.*, 2003). Isso porque o iNOS promove o relaxamento da musculatura do útero durante a gestação para evitar perda embrionária e fetal, mantendo o útero quiescente (Dong *et al.*, 1998).

CONCLUSÕES

Conclui-se que o hipotireoidismo materno altera a expressão espaço-temporal de fatores imunológicos na decídua e na glândula metrial de ratas ao longo da gestação e que a resposta à

hipofunção tireoidiana é variável, dependendo da região e do período analisados. O hipotireoidismo reduz o fator anti-inflamatório iNOS e as células uNKs DBA⁺, principalmente entre 12 e 14 DG, período de maior remodelamento vascular e mais crítico para o desenvolvimento placentário.

AGRADECIMENTOS

Ao auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; CARDUCCI, A. *et al.* Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*, v.131, p.175-182, 2006.
- ASHKAR, A.; DI SANTO, J.P.; CROY, B.A. Interferon γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J. Exp. Med.*, v.192, p.259-270, 2000.
- ASHKAR, A.A.; BLACK, G.P.; WEI, Q. *et al.* Assessment of requirements for IL15 and INF regulatory factors in uterine NK Cell differentiation and function during pregnancy. *J. Immunol.*, v.171, p.2937-2944, 2003.
- BILINSK, M.J.; THORME, J.G.; OH, M.J. *et al.* Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod. BioMed. Online*, v.16, p.218-226, 2008.
- CARTWRIGHT, J.E.; HOLDEN, D.P.; WHITLEY, G.S.J. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, v.128, p.181-189, 1999.
- CHA, J.; SUN, X.; DEY, S.K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.*, v.18, p.1754-1767, 2012.
- CLIFFORD, K.; FLANAGAN, A.M.; REGAN, L. CD56⁺ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum. Reprod.*, v.14, p.2727-2730, 1999.

- COLLINS, M.K.; TAY, C.; ERLEBACHER, A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J. Clin. Invest.*, v.119, p. 2062-2063, 2009.
- COLUCCI, F.; BOULENOUAR, S.; KIECKBUSCH, J. *et al.* How does variability of immune system genes affect placentation? *Placenta*, v.32, p.539-545, 2011.
- DONG, Y.L.; FANG, L.; GANGULA, P.R.R. *et al.* Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression in pregnant rat uterus. *Biol. Reprod.*, v.59, p.933-940, 1998.
- FARIA, M.R.; HOSHIDA, M.S.; FERRO, E.A. *et al.* Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.8, p.95-103, 2010.
- FONTANA, V.A.; SANCHEZ, M.; CEBRAL, E. *et al.* Interferon- γ inhibits metalloproteinase activity and cytotrophoblast cell migration. *J. Reprod. Immunol.*, v.64, p.20-26, 2010.
- GALTON, V.A.; MARTINEZ, E.; HERNANDEZ, A. *et al.* The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*, v.142, p.2123-2128, 2001.
- GELLERSEN, B.; BROSENS, I.A.; BROSENS, J.J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.*, v.25, p.445-453, 2007.
- HAPON, M.B.; SIMONCINI, M.; VIA, G. *et al.* Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproductin*, v.126, p.371-382, 2003.
- HATSUTA, M.; ABE, K.; AMURA, K. *et al.* Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat. *Eur. J. Pharmacol.*, v.486, p.343-348, 2004.
- HOSHIDA, M.S.; GORJÃO, R.; LIMA, C. *et al.* Regulation of gene Expression in Mouse Trophoblast Cells by Interferon-gamma. *Placenta*, v.28, p.1059-1072, 2007.
- HU, D.; CROSS, J.C. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Develop. Biol.*, v.54, p.341-354, 2010.
- KILBY, M.D.; BARBER, K.; HOBBS, E. *et al.* Thyroid hormone action in the placenta. *Placenta*, v.26, p.106-113, 2005.
- KITAYA, K.; NAKAYAMA, T.; OKUBO, T. *et al.* Expression of macrophage inflammatory protein-1 β in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.88, p.1809-1814, 2003a.
- KITAYA, K.; YASUDA, J.; NAKAYAMA, T. *et al.* Effect of female sex steroids on human endometrial CD16 neg CD56 bright natural killer cells. *Fertil. Steril.*, v.79, Suppl.1, p. 730-734, 2003b.
- KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v.35, p.191-202, 2009.
- LEANZA, E.C.; HOSHIDA, M.S.; COSTA, A.F. *et al.* Signaling molecules involved in IFN-gamma-inducible nitric oxide synthase expression in the mouse trophoblast. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.58, p.537-546, 2007.
- LIAO, Q.P.; BUHIMSCHI, I.A.; SAADE, G. *et al.* Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Hum. Reprod.*, v.11, p.2777-2784, 1996.
- MILLER, L.; ALLEY, E.W.; MURPHY, W.J. *et al.* Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J. Leuk. Biol.*, v.59, p.442-450, 1996.
- MONK, J.M.; LEONARD, S.; McBEY, B.A. *et al.* Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. *Placenta*, v.26, p.835-838, 2005.
- PICUT, C.A.; SWANSON, C.L.; PARKER, R.F. *et al.* The metrial gland in the rat and its similarities to granular cell tumors. *Toxicol. Pathol.*, v.37, p.474-480, 2009.
- PLAISIER, M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, v.25, p.259-271, 2011.
- PURCELL, T.L.; BUHIMSCHI, I.A.; GIVEN, R. *et al.* Inducible nitric oxide synthase is present in the rat placenta at the fetal-maternal interface and decreases prior to labour. *Mol. Hum. Reprod.*, v.3, p.485-491, 1997.

- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today*, v.18, p.478-482, 1997.
- REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S. *et al.* Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Devel. Biol.*, v.54, p.355-365, 2010.
- SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental gene profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. *Reproduction*, v.147, p.803-816, 2014.
- SILVA, J.F.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. *Pathol. Res. Pract.*, v.211, p.226-34, 2015.
- SILVA, J.F.; VIDIGAL, P.N.; GALVÃO, D.D. *et al.* Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reprod. Fertil. Devel.*, v. 24, p. 923-931, 2012.
- SOARES, M.J.; CHAKRABORTY, D.; RUMI, M A.K. *et al.* Rat placentation : an experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. *Placenta*, v.33, p.233-243, 2012.
- SOUZA, C.A.; SILVA, J.F.; SILVA, C.L.R. *et al.* Thyroid hormones affect decidualization and angiogenesis in the decidua and metrial gland or rats. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.37, p.1002-1014, 2017.
- TWIG, G.; SHINA, A.; AMITAL, H. *et al.* Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J. Autoimmun.*, V.38, p.275-281, 2012.
- VASILOPOULOU, E.; LOUBIÈRE, L.S.; LASH, G.E. *et al.* Triiodothyronine regulates angiogenic growth factor and cytokine secretion by isolated human decidual cells in a cell-type specific and gestational age-dependent manner. *Hum. Reprod.*, v.1, p.1-12, 2014.
- VIGANÒ, P.; CINTORINO, M.; SCHATZ, F. *et al.* The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin. Immunopathol.*, v.29, p.135-150, 2007.
- YE, W.; ZHENG, L.M.; YOUNG, J.D.E. *et al.* The Involvement of Interleukin (IL) -15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.*, v.184, p.2405-2410, 1996.
- ZHANG, J.; CHEN, Z.; SMITH, G.N. *et al.* Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell. Mol. Immunol.*, v.8, p.1-11, 2011.
- ZHANG, J.H.; YAMADA, A.T.; CROY, B.A. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta*, v.30, p.968-973, 2009.