Juliane Cristina Trevisan Sanches

Efeitos da duração do diabetes *mellitus* tipo 1 sobre a placenta e o desenvolvimento fetal em modelo de camundongos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Juliane Cristina Trevisan Sanches

Efeitos da duração do diabetes *mellitus* tipo 1 sobre a placenta e o desenvolvimento fetal em modelo de camundongos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn
Co-Orientadora: Profa. Estela Maris de Andrade Forell Bevilacqua

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Sanches, Juliane Cristina Trevisan.

Efeitos da duração do diabetes *mellitus* tipo 1 sobre a placenta e o desenvolvimento fetal em modelo de camundongos / Juliane Cristina Trevisan Sanches. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dra. Telma Tenorio Zorn.

Dissertação (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da Reprodução.

Versão do título para o inglês: Effect of duration of Diabetes Mellitus type 1 on the estrous cycle, placenta and fetal development in mouse.

1. Ciclo Estral 2. Placenta 3. Diabetes Mellitus tipo 1 4. Camundongo 5. Matriz extracelular I. Profa. Dra. Telma Maria Tenorio Zorn II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB078/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliane Cristina Trevisan Sanches.

Título da Dissertação: Efeitos da duração do diabetes *mellitus* tipo 1 sobre ciclo estral, a placenta e o desenvolvimento fetal em camundongos.

Orientador(a): Profa. Telma Maria Tenório Zorn

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.065/2009

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 144/02/CEEA, datado de 23.04.02, validade prorrogada até 23.04.2011 e por solicitação da Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos: ***Juliane Cristina Trevisan Sanches, Ambart Ester Covarrubias Cisterna, Marcela Siqueira Gonçalvez, Fernanda Fernandes Farias, Marcos Alexandre Unchiyama Flores, Karina Lie Wakassauqui*** ao Projeto de Pesquisa "*Trata-se de um grupo de projetos que podem ser agrupados em 2 sub-grupos. A: Estudos imunocitoquímicos para rastreamento de moléculas de matriz extracelular e B: Estudos radioautograficos para localização de receptores de estradiol, progesterona e melatonina, ambos nos tecidos uterinos de camundongos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 30 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta tese fosse realizada. Dou inicio agradecendo a meu ***Deus***, pai misericordioso, que me deu forças para enfrentar cada obstáculo, ao longo desta jornada.

"Pela serenidade para aceitar as coisas que eu não pude mudar, coragem para mudar as coisas que eu pude, e sabedoria para diferenciá-las: vivendo um dia de cada vez. Aproveitando um momento de cada vez; aceitando as dificuldades como um caminho para a paz; indagando, como fez Jesus, a este mundo pecador, não como eu teria feito; aceitando que o Senhor tornaria tudo correto se eu me submetesse à sua vontade para que eu seja razoavelmente feliz nesta vida e extremamente feliz com o Senhor para sempre no futuro."

Ao grande incentivador deste titulo meu ***Pai***, meu herói, hoje meu anjo da guarda, que zela por mim onde quer que esteja. Apoiou-me, incentivou, motivou e me proporcionou esta vitória. Você se foi, mas continuará sempre vivo no meu coração. Saudades e amor eterno.

A minha ***Mãe***, mulher guerreira, exemplo, grande amiga, porto seguro, sem você não estaria aqui e não teria tido forças para continuar. Esta conquista também é sua. Deixo aqui o meu muitíssimo obrigado por ser a melhor mãe do mundo, te amo infinito!

Aos meus irmãos, ***Daniela, Isabela e André***, presentes que Deus me deu, que estiveram sempre ao meu lado. E que juntos estamos enfrentando e superando todas as dificuldades da vida, bem como colhendo os frutos dela. Eu compartilho esta vitória com vocês! Amo mais que brigadeiro do Coisas de Formiguinha!

As minhas pequenas ***Isadora e Letícia***, motivos de alegria e motivação todos os dias, a cada nova palavra, cada gracinha, arte entre outras muitas coisas. Tia Bubu ama mais que todos os brigadeiros da Coisas de Formiguinha.

A minha cunhada e grande amiga ***Pri***, você também foi cedo demais e não pôde estar aqui pra compartilhar comigo este momento, mas sei que esta feliz por mim. Saudades!

A toda a minha ***Família*** (Vô, Vó, Dada, Carlos, Rô, Cae, Gabi, tio Dival, Aline, Camilinha, etc...) peças fundamentais em toda a minha vida. Cada momento, cada dia, até cada obstáculo com vocês é mais fácil de enfrentar.

As minhas irmãs de quatro patas, ***Rebeca, Catarina e Menina***, que sempre me receberam, a cada retorno pra casa, com o melhor de todos os abraços, e que sem nenhuma palavra me consolaram e alegraram nos dias difíceis.

A família de coração, meus ***Amigos***, fundamentais nesta longa e dura jornada, vocês são tantos que tenho medo de ser injusta e esquecer-me de mencionar alguém... Mas vamos lá!!

Aos amigos dos ***LBR***: Fernanda Barrence, Ambart Covarrubias, Mariana Ávila, Ayrton Kondo, Marcela Gonçalves, Cleusa Pelegrini, Rodolfo Favaro, Renato Salgado, Rafael Dalbolco, Lucilene Silva, Tamara Coll (nossa argentina).

Aos amigos do ***Trofo's Lab:*** Alexandre Borbely, Rodrigo Barbano, Fernanda Silva, Karoll Nascimento, Mariane Martucci, Rose Farias, Carla Bandeira, Karen Prado, Sara Zago, etc...

Aos amigos do ***Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento:*** Tatiane Donato, Eloisa de Rezende, a todos os professores e funcionários.

Aos amigos de todas as horas:

Da época de colégio: Bruna Almeida, Claudia Ferracini, Camila Araújo, Carolina Gomes, Mariana Nicoletti etc.. Amigas de infância e que levarei para sempre ao meu lado!

Do UniSalesiano: Natalia Felix, Andrea Garcia, Rosemeira Parra, Luis Olveira, Rossana Abud e aos meus queridos alunos... A amizade, incentivo e compreensão!

De São Paulo: Christiane Barros, Luciana Oliveira (irmãzinha cientifica), Karen Steponavicius (cunhadinha cientifica). Ai que saudade dos cafés de fofocas!! Momentos indispensáveis para não surtar!!

Da época de Faculdade: Flávia Beltrame, amiga querida, biomédica, atriz e doutora!! Suas idas a São Paulo sempre renderam madrugadas de conversas intermináveis.Parceiras nas aventuras de nossas vidas de graduandas e pós graduandas.

A minha querida orientadora, ***Profa. Telma Zorn*** pela oportunidade oferecida, pela orientação e amizade, pela compreensão e força nos momentos em que mais precisei de seu apoio. Um exemplo de vida, de profissional e de mulher, merece toda a minha admiração e o meu máximo agradecimento.

A minha coorientadora ***Profa Estela Bevilacqua***, que com suas palavras sabias e amigas sempre me mostrou um caminho a seguir, nos momentos mais difíceis deste percurso.

Ao meu querido ex-orientador ***Prof. Sérgio Ferreira de Oliveira***, que me incentivou a continuar na pesquisa e se manteve sempre a disposição em todos os momentos científicos e pessoais.

A nosso querido ***Prof. Paulo Abrahamsohn***, sábio mestre, detentor de grande sabedoria e dono de conselhos valiosos, além de ser uma pessoa incrível. Foi um grande prazer ter convivido com o Sr no laboratório!

Fernanda não poderia deixar você sem um agradecimento especial. Agradeço imensamente por Deus ter colocado uma pessoa como você no meu caminho, uma profissional incrível, e uma pessoal melhor ainda! Você fez com que meus dias no lab fossem muito mais divertidos e produtivos. Obrigada por tudo!!

Às minhas queridas amigas ***Ambart e Mariana***, pela ajuda, e por todos os momentos divertidos que passamos juntas durante o período em que passamos juntas pelo laboratório.

Rodolfo agradeço por todo o conhecimento compartilhado durante todos estes anos, pelos vários momentos em que se dispôs a me ajudar, ensinando, corrigindo, discutindo nossos resultados e metodologias.

Alê, meu querido amigo, irmão cientifico, agradeço pela nossa alegre e tranquila convivência, que se estende desde o mestrado e espero que siga pra vida toda. E por todas as sugestões ao longo da realização deste trabalho. Sua amizade foi fundamental pra eu chegar até aqui! Nossos cafés no fim de tarde com certeza ficaram guardados no coração.

Nat, você chegou de paraquedas em Ata, e foi em você que encontrei uma grande amiga, pra compartilhar as dificuldades de trabalhar e fazer doutorado ao mesmo tempo, viagens sem fim, madrugadas de insônia, pesadelos com a quali e a defesa. E muitos momentos de gargalhadas sem fim... Obrigada por tudo!

As Profa. **Marinilce Santos**, **Fernanda Ortis** e **Eliana Akamine**, pela disponibilidade em participar e qualidade das criticas e sugestões oferecidas durante meu exame de qualificação, meus sinceros agradecimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e do ICB, que de alguma forma auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

À ***CAPES***, pela bolsa concedida, sem a qual este trabalho não seria possível.

O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

RESUMO

Sanches JCT. Efeitos da duração do diabetes *mellitus* tipo 1 sobre a placenta e o desenvolvimento fetal em camundongos. [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Perdas gestacionais, malformações e restrição de crescimento intrauterino são frequentemente associadas a gestações em portadoras de diabetes, nas quais as placentas apresentam alterações estruturais e funcionais. Adicionalmente, o desenvolvimento de complicações nessas gestações está diretamente relacionado à gravidade e duração do diabetes. Após acumular sólido conhecimento sobre a decidualização e implantação embrionária, nosso grupo desenvolveu um modelo de gestação complicada por diabetes do tipo 1 de longa duração em camundongos, cujas características são comparáveis àquelas observadas em humanos. Os primeiros estudos nesse modelo foram centralizados na fase inicial da gestação e mostraram alterações importantes na taxa de implantação embrionária, nas dimensões dos sítios de implantação e na composição molecular da matriz extracelular (MEC) do endométrio e miométrio. Identificou-se também importantes alterações estruturais e ultraestruturais do miométrio e na proliferação celular desse tecido. Visando a complementação desses estudos, a proposta dessa tese foi analisar nesse modelo, o ciclo estral, o desenvolvimento fetal e a organização placentária com ênfase na expressão e distribuição de moléculas da MEC na região do labirinto. Para isso, o diabetes foi induzido por uma injeção única de aloxana (40mg/Kg). Foram incluídas nos grupos diabéticos as fêmeas que apresentaram glicemia ≥ 400 mg/dL. Essas foram subdivididas em dois grupos: curto prazo (30-50 dias) e longo prazo (90-110 dias) em relação ao tempo de diabetes e o delineamento experimental. Fêmeas controles e diabéticas foram acasaladas com machos normais durante o período noturno e mantidas até o 19º dia de gestação. Placentas e fetos foram coletados, pesados, subdivididos e destinados a técnicas moleculares, bioquímicas e morfológicas. **Ciclo Estral**: os esfregaços vaginais mostraram que o diabetes *mellitus* tipo 1 altera o perfil temporal das fases do ciclo estral que, podendo levar ao anestro. **Desenvolvimento Fetal**: enquanto o diabetes de curto prazo promove altas taxas de perdas embrionárias iniciais e restrição de crescimento intrauterino, o diabetes de longo prazo promove malformações, mortes fetais, restrição de crescimento intrauterino e aumento no peso placentário. **Placenta**: todas as placentas diabéticas apresentaram aumento e desorganização da região da zona juncional e, redução da camada do labirinto com dilatação de seus vasos. O diabetes afetou de modo específico a expressão e deposição dos colágenos tipo I, III e V. Enquanto o diabetes de curto prazo promoveu aumento na expressão e na deposição de colágeno I, no grupo de longo prazo a expressão e deposição do colágeno tipo I foi semelhante ao controle. Interessantemente, a expressão do colágeno tipo III variou apenas nos animais do grupo de curto prazo; 43% apresentaram expressão aumentada desse colágeno e 57% apresentaram valores semelhantes aos do controle mostrando a existência de estratégias de adaptações específicas em cada animal. Entretanto, a deposição do colágeno III na placenta aumentou em ambos os grupos diabéticos. O diabetes de curto prazo diminuiu a expressão do colágeno tipo V embora sua deposição tenha aumentado em ambos os grupos diabéticos. Verificou-se ainda redução da atividade da MMP9 no diabetes de curto prazo e aumento da atividade de MMP2 no grupo de longo prazo. Em conjunto, nossos resultados reforçam a importância do fator temporal para o desenvolvimento de complicações do diabetes sobre a gestação e acresce informações sobre a ação dessa disfunção metabólica no desenvolvimento placentário e fetal. Importantemente, estes resultados mostram que estratégias específicas são desenvolvidas em busca de adaptação dos animais em função da diabetes.

Palavras-chave: Placenta. Diabetes *mellitus* tipo 1. Matriz extracelular. Camundongo.

ABSTRACT

Sanches JCT. Effect of duration of diabetes *mellitus* type 1 on the placenta and fetal development in mouse. [thesis (Doctoral thesis (Cell and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Gestational loss, malformations and intrauterine growth restriction are often associated with pregnancies in women with diabetes, in which the placentas have structural and functional changes. Additionally, the development of complications in these pregnancies is directly related to the severity and duration of diabetes. After accumulating solid knowledge about the mouse decidualization and embryo implantation, our group has developed a model of pregnancy complicated by type 1 diabetes in mice, whose characteristics are comparable to those observed in humans. The first studies on this model were focused on the early stages of gestation and showed important changes in the rate of embryo implantation, dimensions of the implantation sites and on the molecular composition of the endometrial and myometrial extracellular matrix (ECM). In addition, important changes in the structure, ultrastructure and in the cellular proliferation were also identified in the myometrium. Aiming to complement these studies, the proposal of this thesis was to analyze in this model, the estrous cycle, fetal development and the labyrinthine placental organization, with emphasis on the expression and distribution of ECM molecules. To that, diabetes was induced by a single injection of alloxan (40 mg/Kg). Females who have blood glucose ≥ 400 mg/dL were included in diabetic group. They were then subdivided into two groups: short term (30-50 days) and long term (90-110 days) in relation to diabetes duration and the experimental design. Controls and diabetic females were mated with normal males during the night, and maintained until the 19th day of gestation. Placentas and fetuses were collected, weighed and distributed for biochemical, morphological and molecular approaches. **Estrous cycle**: vaginal smears showed that the diabetes *mellitus* type 1 alters the temporal profile of the estrous cycle stages that depending on the duration of diabetes, in some cases may lead to anestrus. **Fetal development**: while short-term diabetes promotes high rates of early embryonic losses and intrauterine growth restriction, long-term diabetes promotes malformations, fetal deaths, intrauterine growth restriction and increased placental weight. **Placenta**: diabetic placentas were larger than controls and exhibited structural disorganization of the junctional zone, reduced labyrinth region and dilatation of its blood vessels. The duration of diabetes also have specifically affected the expression and deposition of collagens type I, III and V. Whereas in short-term diabetes the expression and the deposition of collagen I were increased, in the long term group, the expression and deposition of type I collagen were similar to control. Interestingly, the expression of collagen type III varied only in animals of the short-term group; 43% showed increased expression of collagen and 57% showed values similar to those of the control. Curiously, the deposition of collagen III was increased in both diabetic groups. In addition, whereas short-term diabetes decreased the expression of collagen type V, its deposition increased in both diabetic groups. It was also found reduced activity of MMP-9 in short-term diabetes and increased activity of this enzyme in long-term group. Together, our results reinforce the importance of the time factor for the development of diabetic complications on pregnancy. Additionally, the present results add new and relevant information concerning this metabolic dysfunction in placental and fetal development. Importantly, these results show that specific strategies are developed seeking for better adaptations to the diabetes.

Keywords: Placenta. Diabetes *mellitus* type 1. Extracellular matrix. Mouse.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenvolvimento da placenta de camundongos. 23
Figura 2: Características morfológicas do ciclo estral do grupo controle. 42
Figura 3: Imagens de esfregaços vaginais obtidos diariamente de um mesmo animal por 10 dias consecutivos, após 10 dias da indução do diabetes.. 42
Figura 4: Imagens de esfregaços vaginais obtidos diariamente de um mesmo animal por 10 dias consecutivos, após 10 dias da indução do diabetes. 43
Figura 5: Alterações do ciclo estral nos animais diabéticos após 10 dias da indução do diabetes. 43
Figura 6: Sequência de esfregaços vaginais coletados ao longo de 10 dias, após 40 da indução da diabetes. 44
Figura 7: Perfil reprodutivo de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. 44
Figura 8: Gráfico de distribuição de peso de placentário (A) e fetal (B) de fêmeas sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução.. 45
Figura 9: Correlação entre peso fetal e placentário de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. 46
Figura 10: Morfologia da placenta. 47
Figura 11: Histomorfometria placentária de animais controle e após 30-50 e 90-110 dias de indução do diabetes.. 48
Figura 12: Coloração pelo picrosirius e imunofluorescência de componentes da MEC.. 49
Figura 13: Expressão gênica de componentes da MEC avaliada por qRT-PCR em placentas dos grupos de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. 50
Figura 14: Avaliação quantitativa dos ensaios de zimografia em gel para MMP2 e MMP9 realizados em placentas dos grupos experimentais sem indução de diabetes (controle) e após 30 e 90 dias de indução. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados no qPCR.....38
Tabela 2: Parâmetros fisiopatológicos ao final da gestação 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: *American Diabetes Association*

AID: Associação Internacional de Diabetes

NOD: Camundongos diabéticos não obesos, do inglês *non-obese diabetic mouse*

CEEA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Col1a1: RNAm do colágeno tipo 1 alfa 1

Col3a1: RNAm do colágeno tipo 3 alfa 1

Col5a1: RNAm para o colágeno tipo 5 alfa 1

CTG: Células trofoblásticas gigantes secundárias

D: Dias após a indução do diabetes

DG: Dia da gestação

DMG: Diabetes *Mellitus* gestacional

Fn1: RNAm para fibronectina

FSH: Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofina

IADPSG: Grupo da Associação Internacional de Estudo de Gravidez, do inglês International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups

LBR/MEC: Laboratório de Biologia da Reprodução & Matriz Extracelular

LH: Hormônio luteinizante

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteinases

NKu: Linfócitos *natural killer* uterinos

SNC: Sistema nervoso central

uPA: Fator ativador de plasminogênio tipo uroquinase

PAS: Reação do ácido periódico de Schiff

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TIMP: Inibidores de metaloproteinases tecidual

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔΔCt: Comparative Ct Method

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **18**
1.1 Ciclo reprodutivo ***19***
1.1.1 Proestro ***19***
1.1.2 Estro ***19***
1.1.3 Metaestro ***20***
1.1.4 Diestro ***20***
1.2 Implantação e decidualização ***21***
1.3 Placentação ***22***
1.4 Diabetes mellitus ***25***
1.4.1 Diabetes mellitus tipo 1 ..... ***25***
1.4.2 Diabetes mellitus tipo 2 ..... ***26***
1.4.3 Diabetes mellitus gestacional (DMG) ***26***
1.4.4 Alterações hormonais ***26***
1.4.5 Alterações gestacionais ***27***
2 OBJETIVOS **31**
2.1 Definição do perfil fisiopatológico e reprodutivo do modelo de diabetes por meio da avaliação dos seguintes parâmetros: ***32***
2.2 Avaliação da placenta e do feto por meio de: ***32***
3 MATERIAL E MÉTODOS **33**
3.1 Indução do diabetes ***34***
3.2 Esfregaços vaginais ***34***
3.3 Acasalamento e coleta de amostras ***34***
3.4 Análises histomorfométricas ***35***
3.5 Identificação de colágeno e de células de glicogênio ***36***
3.6 Imunolocalização ***37***
3.7 PCR em tempo real ***37***
3.8 Zimografia ***38***
3.9 Análises estatísticas ***39***
4 RESULTADOS **40**
4.1 Parâmetros fisiopatológicos do modelo ***41***
4.2 Ciclo estral ***41***
4.3 Perfil reprodutivo ***44***

4.4 Perfil gestacional *45*
4.5 Morfologia e morfometria da placenta *46*
4.6 Análise dos componentes da MEC *46*
4.6.1 Imunolocalização *47*
4.6.2 Expressão e degradação das moléculas da MEC *48*
5 DISCUSSÃO **52**
5.1 Parâmetros fisiopatológicos *53*
5.2 Ciclo estral *53*
5.3 Perfil reprodutivo *54*
5.4 Perfil gestacional *55*
5.5 Morfologia placentária *56*
5.6 Matriz extracelular *56*
6 CONCLUSÕES **60**
REFERÊNCIAS **62**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo reprodutivo

O ciclo reprodutivo de camundongos é conhecido como ciclo estral e, do mesmo modo que o ciclo menstrual de mulheres é marcado por mudanças na estrutura dos órgãos genitais e dos tecidos uterinos. O ciclo estral tem duração de 4 a 5 dias e nele são reconhecidas quatro fases, cada qual com características morfológicas e duração distintas. As fases do ciclo estral podem ser identificadas pelas características morfológicas e tintoriais de esfregaços vaginais, corados por meio da técnica descrita por Shorr (1) e, também, pelas características morfológicas do útero (2). O ciclo estral é subdividido em quatro fases: *proestro*, *estro*, *metaestro* e *diestro* cujas características morfofuncionais serão descritas a seguir.

1.1.1 Proestro

O **proestro** tem duração média de 12 horas e é considerado como a fase preparatória para a receptividade ao macho. Histologicamente esta fase é caracterizada pela proliferação dos fibroblastos endometriais e por considerável aumento dos capilares sanguíneos no estroma endometrial. Estas modificações são promovidas pelo estrógeno produzido por células da camada granulosa dos folículos ovarianos em processo de desenvolvimento. Os níveis séricos de estrógeno em elevação também atuam estimulando a atividade proliferativa do epitélio vaginal. O esfregaço vaginal é caracterizado pela predominância de células basais e intermediárias. As células basais apresentam-se arredondadas, com núcleo de cromatina frouxa e são, em sua maioria, basófilas quando coradas pelo Shorr (2,3). Esta fase também se caracteriza pela ausência quase total de leucócitos.

1.1.2 Estro

Durante o **estro**, as fêmeas encontram-se receptivas ao macho. Nesta fase, o útero se se comparado ao proestro, encontra-se edemaciado e hipertrofiado, com vasos sanguíneos mais dilatados e evidentes. Além disso, a luz uterina está ramificada e o endométrio repleto de glândulas. A alta produção de estrógeno pelas células granulosas dos folículos ovarianos induz a liberação do hormônio luteinizante (LH) pela hipófise, responsável pela ruptura dos folículos ovarianos maduros e liberação dos ovócitos. A duração média desta fase é de 24 horas. O epitélio vaginal apresenta máxima espessura e suas células superficiais são

cornificadas e anucleadas. Estas células poligonais, anucleadas e acidófilas predominam no esfregaço vaginal, isoladas ou em grumos (2,3).

1.1.3 Metaestro

Esta fase ocorre após a ovulação, quando os níveis de progesterona aumentam em consequência da formação do corpo lúteo. Células epiteliais glandulares e luminais do endométrio ainda se encontram em atividade proliferativa identificada por numerosas figuras de mitose. Ocorre também o início da migração de leucócitos polimorfonucleares através do epitélio luminal. Esta fase dura aproximadamente 10 horas e pode ser dividida em Metaestro I e II de acordo a predominância dos tipos celulares encontrados no esfregaço vaginal. O metaestro I é caracterizado por esfregaços com células epiteliais superficiais cornificadas e também da camada intermediaria. Os esfregaços contêm grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares. No metaestro II ocorre aumento de células epiteliais intermediarias e basais e de leucócitos polimorfonucleares (2,3).

1.1.4 Diestro

O diestro, a fase de duração mais longa do ciclo estral (de 54 a 57 horas), é caracterizada pelo predomínio de progesterona circulante. As dimensões e a morfologia do útero são semelhantes às observadas em proestro. É um período marcado pela regeneração do útero a partir da proliferação e diferenciação de fibroblastos do estroma endometrial. O esfregaço vaginal nesta fase é caracterizado essencialmente pela presença de muco e leucócitos polimorfonucleares e poucas células epiteliais basais (2,3).

O diestro pode ter sua duração alongada, caracterizando o **anestro**, situação em que o ciclo reprodutivo encontra-se interrompido (3). A interrupção do ciclo pode ocorrer como consequência do envelhecimento do animal, ou ainda por alterações da sinalização sobre o eixo hipotálamo-hipófise-ovários (4).

Na ocorrência de acasalamento durante o estro, o corpo lúteo se mantém funcional e sintetiza além de estrógeno, altos níveis de progesterona. Ambos os hormônios atuarão via receptores específicos, nos tecidos uterinos preparando o endométrio para a implantação do embrião. Caso não ocorra o acasalamento, os corpos lúteos degeneram (5,6).

1.2 Implantação e decidualização

Durante a gestação, o endométrio sofre uma série de modificações celulares, moleculares e funcionais necessárias para receber e desenvolver o embrião. A interação do embrião com o organismo materno ocorre por meio de uma relação celular e molecular dinâmica conhecida como "**interface materno–fetal**". Essa interação envolve quatro etapas: (i) a implantação do embrião (ii), a formação da decídua (iii), a invasão dos vasos endometriais pelo trofoblasto (iv) e a formação da placenta (7,8).

O estroma endometrial de animais não prenhes é formado por tecido conjuntivo frouxo que abriga uma população especial de fibroblastos capazes de responder de modo específico aos hormônios esteróides ovarianos. Os fibroblastos endometriais exibem longos processos citoplasmáticos e são imersos em abundante matriz extracelular (MEC) (9).

Após o acasalamento, e sob a influência sequencial dos hormônios ovarianos estrógeno e progesterona, o endométrio é preparado para receber o embrião. Em camundongos, a implantação ocorre na manhã do 5º dia de gestação (DG) e promove modificações estruturais e funcionais nos diferentes compartimentos uterinos. A mais marcante delas é a aquisição de um **fenótipo epitelióide** pelos fibroblastos endometriais da **região antimesometrial** uterina. Este novo fenótipo é traduzido na aquisição progressiva de novas propriedades funcionais e que levam à formação, de um novo tipo celular denominado de **célula decidual** (10–13). Em contraste com os fibroblastos que lhes deram origem, as células deciduais são volumosas e poligonais. O retículo endoplasmático granular e o complexo de Golgi são bem desenvolvidos nestas células. Esses fibroblastos passam a ter um arranjo epitelióide por meio do desenvolvimento de extensas áreas de junções intercelulares, onde se alternam junções do tipo aderentes e comunicantes (14). Destaca-se, durante este processo de modificação tecidual, a expressão de proteínas como a conexina 46 (15) e a desmina (16), ambas consideradas como marcadores da diferenciação decidual.

A **decidualização** em roedores se inicia no estroma subepitelial da região antimesometrial do endométrio que circunda a cripta onde o embrião está implantando (7,17) estendendo-se, posteriormente, para as regiões mais profundas em direção ao miométrio. Nos dias subsequentes (6º-8ºDG) à implantação do embrião, este processo se expande para a região mesometrial do útero. As populações celulares destas duas regiões têm morfologia, função e destinos diferentes no decorrer da gestação (12,18). Enquanto a **decídua antimesometrial** é uma estrutura transitória que, em camundongos, involui do 9º ao 14ºDG

(19), a **decídua mesometrial** constituirá a porção materna da placenta permanecendo até o final da gestação.

Muitas são as funções propostas para a decídua antimesometrial: i) fornece suporte estrutural e nutricional (10,19–22); ii) funciona como uma glândula endócrina provisória produzindo uma série de moléculas, entre elas hormônios e fatores de crescimento (23–27); iii) atua no controle da invasão do trofoblasto e (iv) na modulação do sistema imunológico materno (28–32).

Por meio dessas ações biológicas, a decídua antimesometrial atua como uma estrutura essencial para a convivência de tecidos geneticamente diferentes como são os maternos e os embrionários (14).

Um dos principais focos de investigação do Laboratório de Biologia da Reprodução (LBR/MEC) nos últimos anos é a matriz extracelular (MEC) do endométrio. Esses estudos mostraram que a formação da decídua é acompanhada de uma profunda remodelação da MEC abrangendo vários tipos de colágeno, (29,31,33–35), glicosaminoglicanos (36) e proteoglicanos (37–39). A decídua e a matriz extracelular a ela associada, desempenham funções essenciais para o sucesso gestacional que compreende o desenvolvimento do embrião e a formação da placenta.

1.3 Placentação

A placenta é um órgão provisório responsável pelos processos de nutrição, excreção e outras importantes funções do embrião. Assim como a implantação, o processo de formação e organização da placenta envolve a interação de células de ambos os organismos, materno e fetal, que varia vastamente entre as diferentes espécies.

A placenta se desenvolve como consequência de um complexo processo de diferenciação de células derivadas do **blastocisto** e de células maternas. Células do blastocisto originam: células trofoblásticas, células mesenquimais, vasos sanguíneos e células sanguíneas fetais enquanto que os componentes maternos da placenta em primatas e roedores estão representados por células deciduais mesometriais, vasos sanguíneos, células do sistema imunológico e células sanguíneas maternas. Deste modo, células derivadas de ambos, blastocisto e mãe, formam a **interface materno-fetal**, local onde as células dos dois indivíduos estão intimamente associadas e interagindo entre si. A comunicação entre estes dois organismos, na região da interface materno-fetal, é fundamental para o desenvolvimento adequado do concepto e, consequente sucesso da gestação (40,41).

Na placenta de roedores (Figura 1), os componentes maternos se organizam em uma estrutura denominada de **decídua mesometrial**, enquanto os componentes fetais são originados a partir da diferenciação do **cone ectoplacentário** e do **ectoderma extraembrionário** associado ao **mesoderma alantoideano**.

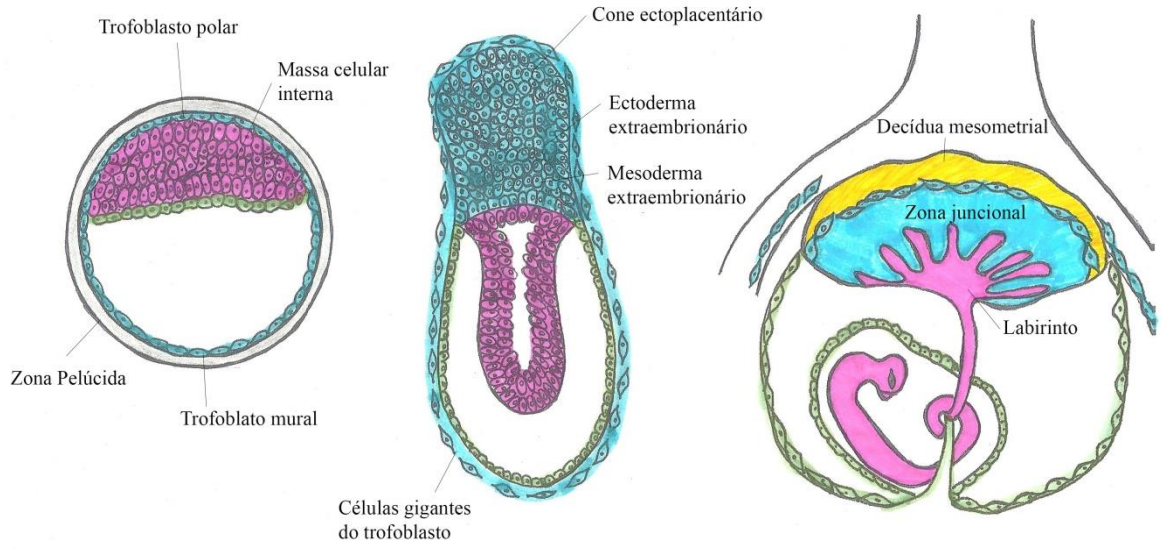

Figura 1 – Desenvolvimento da placenta de camundongos. Adaptado Malassiné et al 2003 e Rossant e Cross 2001 (40,41)

O desenvolvimento da **decídua mesometrial** é posterior àquele da decídua antimesometrial e se inicia entre o 6º e 8ºDG. Esse processo envolve, essencialmente, a transdiferenciação dos fibroblastos mesometriais em células deciduais. As decíduas antimesometrial e mesometrial têm destinos e funções diferentes. Enquanto a primeira constituiu uma barreira inicial à invasão do trofoblasto a segunda dará origem à placenta. O processo de decidualização desta região também se caracteriza pela migração de linfócitos granulosos (denominados de *natural killer* uterinos (NKu) e células imunorreguladoras e, por uma intensa angiogênese, que leva à formação de uma ampla rede vascular (42). As células deciduais mesometriais e as NKu participam da morfogênese decidual, da remodelação dos vasos sanguíneos mesometriais e do controle da invasão do trofoblasto, processos imprescindíveis para o estabelecimento da circulação materno-fetal (43,44).

O **trofectoderma** é a primeira população celular a se diferenciar no embrião e forma o revestimento externo do blastocisto. Internamente, está a **massa celular interna** formada por um aglomerado de poucas células indiferenciadas as quais, posteriormente, darão origem a todo o corpo do embrião e, uma cavidade denominada de **blastocele**. As células do trofectoderma que se sobrepõem à massa celular interna se diferenciam no **trofoblasto polar**,

enquanto que as demais formam o **trofoblasto mural**. Na região mural ocorre a diferenciação das **células trofoblásticas gigantes primárias** responsáveis pela implantação do blastocisto na região antimesometrial uterina. Com o desenvolvimento embrionário, as células trofoblásticas gigantes passam também a revestir externamente, o **saco vitelínico**. Estas células gigantes são as primeiras a invadir a decídua antimesometrial abrindo os capilares endometriais e fazendo contato com o sangue materno.

Ainda nas fases precoces da implantação embrionária as células do trofoblasto polar originam duas estruturas: o **ectoderma extraembrionário** e o **cone ectoplacentário**. Ao se associar com o **mesoderma alantoideano** o ectoderma extraembrionário origina o **cório (~9º DG)**, estruturando a **placenta corioalantoideana** ou definitiva.O mesoderma alantoideano induz a formação dos vasos fetais da placenta e, desta forma, da organização do **labirinto placentário,** responsável pelas trocas moleculares entre mãe e feto (45–47).

O **cone ectoplacentário** é formado por **células trofoblásticas gigantes secundárias** situadas perifericamente em contato com a decídua, e por um grupo de células próximas ao embrião. Essas células proliferam e, posteriormente, darão origem ao **espongiotrofoblasto.**

A **placenta corioalantoideana** madura é subdividida em quatro regiões: (i) decídua mesometrial, (ii) zona juncional (região formada por células trofoblásticas gigantes secundárias (CTG) e células do espongiotrofoblasto, dentre as quais se também estão presentes células de glicogênio), (iii) labirinto e (iv) placa coriônica (40,45). A zona juncional produz e armazena hormônios e fatores de crescimento com inúmeras funções, inclusive a de participar na indução da formação de capilares fetais do labirinto subjacente (41).

As células gigantes trofoblásticas secundárias invadem e fagocitam a decídua mesometrial (46). Durante este processo estas células expressam e secretam o fator ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) e metaloproteinases (MMP), enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da matriz extracelular e na regulação da migração e adesão celulares (48,49). As células gigantes trofoblásticas secundárias cessam a invasão da decídua mesometrial ao redor do 13º DG. Uma segunda população de células trofoblásticas , as células de glicogênio também adquirem um comportamento invasivo a partir do 10º DG (50) participando da remodelação dos vasos arteriais endometriais, na medida em que substituem as camadas endotelial e muscular. Estas células também expressam uPA durante sua fase invasiva (48). As células do espongiotrofoblasto e as células gigantes trofoblásticas secundárias secretam e armazenam hormônios, como as proteínas A e B semelhantes à prolactina (51) e o hormônio lactogênio placentário (52).

O sangue materno atravessa parte da decídua mesometrial e a zona juncional por meio de canais arteriais revestidos por células trofoblásticas, alcançando a placa coriônica. Finalmente, em um fluxo reverso, o sangue alcança a região do labirinto e banha o trofoblasto, permitindo, dessa maneira, o intercâmbio molecular entre os organismos materno e fetal. No labirinto, o trofoblasto se organiza em três camadas: duas camadas sinciciais (sinciciotrofoblasto), em contato com os vasos sanguíneos fetais, e uma camada de células individualizadas (citotrofoblasto) em contato com sangue materno.

1.4 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia que resulta de defeitos na secreção de insulina, na ação inadequada da insulina, ou de ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes promove danos em diferentes órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (53).

Os sintomas de hiperglicemia exacerbada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes polifagia, além de visão turva. Alteração no crescimento e susceptibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia crônica. O diabetes não controlado e de longa duração pode levar à alterações mais graves que incluem retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando à insuficiência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras e amputações nos pés, e, neuropatia autonômica causando sintomas cardiovasculares, gastrointestinais, genitourinários e disfunção sexual (53).

1.4.1 Diabetes mellitus tipo 1

Designando em tempos passados como diabetes juvenil ou insulinodependente, o Diabetes *Mellitus* tipo 1 é resultante da destruição autoimune das células β do pâncreas, levando, geralmente, à absoluta deficiência de insulina. Representa de 5-10% dos casos de diabetes. Aparece comumente na infância e adolescência, embora possa surgir na vida adulta. A destruição autoimune das células β é influenciada por fatores genéticos e ambientais e, muito possivelmente, por outros fatores ainda não completamente conhecidos (53).

Os portadores dessa doença, raramente são obesos. Alguns pacientes, em particular crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Outros têm modesta hiperglicemia em jejum, que pode mudar rapidamente à hiperglicemia grave e/ou cetoacidose na presença de infecção ou outro estresse (53).

1.4.2 Diabetes mellitus tipo 2

Esse tipo de diabetes representa cerca de 90-95% dos casos de diabetes. No passado era referida como diabetes não insulinodependente ou diabetes do adulto. Abrange indivíduos que têm resistência à insulina e, geralmente, têm relativa deficiência de insulina, podendo esta tornar-se absoluta.

A resistência à insulina é caracterizada pela incapacidade dos tecidos de responder à insulina devido a alterações nas vias de sinalização disparadas pelos receptores de insulina. A maioria desses pacientes é obesos e, a condição de obesidade, pode provocar algum grau de resistência à insulina. Em geral, nos pacientes não obesos o aumento da porcentagem de gordura corporal está predominantemente distribuída, na região abdominal. A cetoacidose raramente ocorre espontaneamente.

O risco de desenvolver esta forma de diabetes aumenta com a idade, a obesidade, e falta de atividade física. Ocorre mais frequentemente em mulheres com prévia diabetes *mellitus gestacional* (DMG) e em indivíduos com hipertensão ou dislipidemia, e varia de acordo com raças e subgrupos étnicos. Frequentemente é associada com uma forte predisposição genética, ainda não completamente elucidada (53).

1.4.3 Diabetes mellitus gestacional (DMG)

Por anos, o DMG foi definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeiro reconhecimento durante gravidez. Embora a maioria dos casos se resolva após o parto, não se exclui a possibilidade de extensão da intolerância à glicose após a gestação.

Desde 2008, a Associação Internacional do Diabetes (AID) e o Grupo de Estudo de Gravidez (IADPSG) juntamente com representantes de organizações obstétricas e diabéticas, incluindo a *American Diabetes Association* (ADA), estabeleceram um consenso internacional recomendado que mulheres que apresentem fatores de risco para a diabete na primeira consulta do pré-natal sejam mais bem investigadas ao longo da gestação (53).

1.4.4 Alterações hormonais

O diabetes também está associado a desequilíbrios nos níveis e na ação dos hormônios esteroides sexuais levando ao comprometimento da função reprodutiva. O diabetes parece interferir na produção dos hormônios esteroides sexuais em múltiplos níveis. Entretanto, os

mecanismos responsáveis por esta associação, não estão ainda completamente esclarecidos (54). Neste contexto, nota-se que as portadoras de diabetes *mellitus* do tipo 1 apresentam acentuado atraso da menarca, irregularidades do ciclo menstrual, amenorreia (oligomenorréia ou polimenoréia), menopausa precoce e baixa fertilidade (55–58).

Estudos demonstram que, em humanos, tanto o diabetes tipo 1 quanto o tipo 2 são caracterizados por diminuição dos níveis circulantes de estrogênio (59,60). Ressalta-se, que as portadoras de diabetes do tipo 1 apresentam redução precoce nos níveis de estrogênio ainda na fase de pré-menopausa, sugerindo que este declínio hormonal não seja diretamente relacionado com a idade. Além dos níveis de estrogênio reduzidos, as mulheres portadoras de diabetes tipo 2 também apresentam níveis de androgênios elevados (61). Há sugestão de que a hiperinsulinemia reduz a capacidade dos ovários para converter andrógenos em estrogênio, provavelmente devido a uma redução da atividade da aromatase ovariana (61).

Semelhante aos resultados obtidos em humanos, modelos animais de diabetes apresentaram além de redução na produção de progesterona, valores reduzidos de estrógeno (62–64). Esses achados sugerem que a esteroidogênese esteja relacionada com a diminuição da secreção do hormônio liberador de gonodotrofina (GnRH) (65) e/ou de gonadotrofinas, promovendo, consequentemente, redução no número de seus receptores nas células do ovário ou ainda, alterações na afinidade destes hormônios aos seus receptores (62).

Camundongos NOD, do inglês *non-obese diabetic mouse*, apresentam modificações genéticas que aumentam a frequência de desenvolvimento de diabetes autoimune. As fêmeas NOD desenvolvem diabetes com maior frequência do que os machos. Machos submetidos à orquidectomia também apresentam maior suscetibilidade para desenvolver diabetes (66). Estes dados indicam que os hormônios sexuais influenciam no desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD.

No entanto, em modelos animais, o efeito das drogas utilizadas para indução do diabetes sobre o eixo hipotálamo-gônada ainda não está completamente esclarecido (67,68).

1.4.5 Alterações gestacionais

As gestações diabéticas estão associadas com uma maior incidência de perdas gestacionais, malformações, retardo do crescimento intrauterino ou macrossomia (69). As causas destas alterações ainda não foram totalmente esclarecidas, entretanto, a identificação dos fatores que contribuem para as complicações do diabetes na gestação é fundamental para o seu entendimento. Neste contexto é importante reconhecer que existem diferentes tipos de

diabetes, com características distintas. As diferenças no tempo e tipos de diabetes podem explicar a ocorrência de resultados contraditórios como o retardo do crescimento intrauterino *vs.* macrossomia. Na maioria das gestantes portadoras de diabetes do tipo 1 severo observa-se vasculopatia (grupos C e D de White), que leva à restrição no peso da placenta e fetal. Entretanto, na maioria das gestantes portadoras de diabetes gestacional e do tipo 2, o peso das placentas e dos fetos é maior, possivelmente devido a ausência de vasculopatia (grupos A e B de White) (70).

Apesar da variabilidade de eventos existem inúmeras evidências de que as placentas de gestações diabéticas apresentam alterações estruturais e funcionais (71). O ambiente uterino comprometido pelo diabetes resulta em aumento da produção de fatores pró-inflamatórios como espécies reativas de oxigênio, citocinas e prostaglandinas, óxido nítrico e peroxinitritos, representando um desafio para o adequado desenvolvimento do embrião (72,73).

Sabe-se também que níveis elevados de glicose plasmática levam à alteração da expressão de genes de moléculas da MEC em vários tecidos como, por exemplo, células renais (74,75) e endoteliais (76). Esses dados sugerem que as alterações na expressão e distribuição dessas moléculas são características comuns desta doença (77). Dentre estas alterações observou-se maior síntese de colágeno (78), diminuição na síntese de proteoglicanos ricos em heparam-sulfato (79,80) e aumento da expressão de laminina (81).

Laurin et al. (82) observaram que as placentas de pacientes portadoras de diabetes apresentam grande quantidade de vilosidades coriônicas imaturas. Esta deficiência foi associada com disfunções na placenta, promovidas pelo aumento da distância entre o espaço interviloso e os capilares fetais. Outros estudos (83,84) descrevem alterações na deposição de fibronectina na região do labirinto da placenta de ratas diabéticas indicando, que esta molécula, pode estar envolvida com as alterações do microambiente da interface materno-fetal. Forsberg e colaboradores (84) relataram ainda alterações no colágeno IV e na laminina na região do labirinto.

Em humanos, em gestações normais, o proteoglicano perlecam, que se co-localiza com a laminina e o colágeno IV nas membranas basais de células trofoblásticas e de vasos placentários, tem seus níveis de RNAm reduzidos com o avanço da idade gestacional. No entanto, em pacientes com diabetes *mellitus* gestacional foi observado um significativo aumento na expressão do perlecam nas placentas de terceiro trimestre que podem estar associado com as alterações estruturais observadas durante a maturação da placenta (85).

O crescimento e desenvolvimento fetal dependem da função placentária normal. Algumas formas de retardo de crescimento intrauterino têm sido relacionadas com distúrbios no fluxo sanguíneo placentário e com a transferência de nutrientes da mãe para o feto (86).

Modelos animais utilizados em um estudo sobre a influência do diabetes na gestação, demonstraram alterações no desenvolvimento pré-natal e a ocorrência de malformações. Entretanto, observa-se grande diversidade nos resultados destes experimentos, dependendo da espécie, do esquema de indução utilizado e das características do diabetes (87).

Embora o camundongo tenha sido amplamente utilizado em tais estudos pouco se conhece sobre a influência do diabetes de longa duração na placenta destes animais. Yu e colaboradores (88) analisaram placentas de camundongos com diabetes de curta duração, relatando aumento da região do espongiotrofoblasto e das células de glicogênio e alterações na expressão de genes relacionados com o controle do crescimento da placenta.

Em humanos, a duração do diabetes é reconhecida como um fator determinante para o desenvolvimento de suas complicações que ocorrem em diferentes sistemas incluindo o sistema reprodutor (4). Entretanto, o impacto da duração do diabetes sobre os processos reprodutivos ainda não havia sido explorado adequadamente em modelos animais. Para isso, recentemente, foi desenvolvido no LBR/MEC um modelo de diabetes do tipo 1 de longo prazo (90 dias) em camundongos apropriado para o estudo dos efeitos desta doença sobre a gestação (89,90). Nesse modelo, o diabetes é induzido por aloxana e resulta na presença de parâmetros fisiológicos clássicos do diabetes do tipo 1, tais como: altos níveis de glicemia, insulinemia, glicosúria, diminuição do peso corporal e aumento do consumo de água e ração (89,90). Os estudos realizados nesse modelo foram centralizados na fase inicial da gestação e mostraram alterações importantes na taxa de implantação embrionária, nas dimensões da decídua e na composição da MEC do endométrio e miométrio. Mostraram ainda uma relação direta entre a duração do diabetes e a gravidade dessas alterações. Além disso, observou-se importantes alterações na estrutura dos tecidos e na ultraestrutura celular, além da redução na proliferação das células musculares do miométrio (89).

Outros estudos de nosso grupo, utilizando um modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina em ratas, após o inicio da gestação, mostraram que o diabetes afeta a região do espongiotrofoblasto (83). Estes autores mostram pela primeira vez que algumas moléculas da matriz extracelular são moduladas durante o desenvolvimento da placenta. As ratas diabéticas apresentaram aumento da deposição de fibronectina exclusivamente na região do labirinto, evidenciando que o diabetes altera o microambiente na interface materno-fetal,

contribuindo para o desenvolvimento de anormalidades na prole (83). Observou-se aumento na proliferação celular e aumento da região do espongiotrofoblasto (91).

Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi dar continuidade à esta linha de pesquisa estudando o efeito da duração do diabetes em fases mais tardias da gestação, tendo como foco principal a placenta e o desenvolvimento fetal no modelo de diabetes tipo 1 em camundongos. O objetivo específico dessa tese é analisar a organização placentária e a expressão, deposição e distribuição de moléculas da MEC na região do labirinto e também determinar os efeitos do diabetes sobre o desenvolvimento fetal nesse modelo.

2 OBJETIVOS

Considerando a importância da placenta para o desenvolvimento embrionário/fetal e os dados obtidos pelo nosso laboratório sobre o impacto do diabetes tipo 1 no processo de decidualização em camundongos (89,90), a proposta deste estudo é identificar alterações promovidas pelo diabetes tipo 1 e analisar suas consequências sobre o perfil reprodutivo e desenvolvimento fetal e placentário, por meio do seguinte desenho experimental:

2.1 Definição do perfil fisiopatológico e reprodutivo do modelo de diabetes por meio da avaliação dos seguintes parâmetros:

i. Glicemia, glicosúria e peso corporal;
ii. Duração do ciclo estral e citologia vaginal;
iii. Eficiência reprodutiva: número total de implantações; reabsorções; fetos viáveis; mortes fetais e malformações.

2.2 Avaliação da placenta e do feto por meio de:

i. Determinação do peso placentário e fetal;
ii. Análises morfológicas e histomorfométricas dos compartimentos placentários;
iii. Imunolocalização de moléculas da MEC, colágenos do tipo I, III, IV e V e laminina;
iv. Análise da expressão do RNAm por PCR em tempo real dos colágenos do tipo I, III e V;
v. Análise da atividade das MMP2 e MMP9 por meio de zimografia em gel.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Indução do diabetes

Foram utilizadas fêmeas de camundongo da espécie *Mus musculus domesticus, CD-1* variedade *Swiss*, a partir de 60 dias de idade. O diabetes foi induzido por meio da administração de 40 mg/Kg de aloxana (Sigma) intravenosa após as fêmeas serem privadas da ração por pelo menos 16 horas. Os animais controle receberam o mesmo volume de solução salina, sob as mesmas condições (n = 18). A determinação da glicemia foi realizada após 7 dias, utilizando-se um glicosímetro Accu-Chek Advantage II® (Roche Diagnostics, Basel Suiss). Os animais com glicemia acima de 400 mg/dL foram incluídos nos grupos diabéticos (n = 17). Para a determinação da glicosúria foram utilizadas as fitas de teste Keto-Diabur Test (Roche).

O protocolo para uso de animais em experimentação foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo (144/2002), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Esfregaços vaginais

Durante a manutenção dos animais o ciclo estral foi avaliado pela técnica de Shorr (1). Os esfregaços vaginais foram realizados em dois momentos distintos: entre 20 e 30 dias (n = 15) e entre 40 e 50 dias após a indução da diabetes (n = 13). O material foi coletado com o auxílio de um micro aplicador descartável (Cavibrush) introduzido cautelosamente na vagina do animal. As amostras foram, em seguida, aplicadas sobre a superfície de uma lâmina histológica limpa. Após secagem rápida à temperatura ambiente, as lâminas foram colocadas em solução fixadora de etanol 70% - éter etílico (1:1 v/v) por 10 minutos e em seguida submetidas à coloração de Shorr (1,3) para determinação das fases do ciclo estral. As laminas foram cobertas com bálsamo e lamínulas e foram analisadas com auxílio de microscópio de luz Nikon Eclipse E600; as imagens foram capturadas por uma câmera digital DP72 (Olympus), integrada ao microscópio.

3.3 Acasalamento e coleta de amostras

As fêmeas controles e diabéticas foram acasaladas com machos normais durante o período noturno. No grupo diabético o acasalamento foi promovido em dois momentos: entre 30 e 50 dias (n = 8) e entre 90 e 110 dias após a indução do diabetes (D) (n = 9). A presença da rolha vaginal, indicativo de acasalamento, foi considerada como 1º dia da gestação (DG). As fêmeas foram sacrificadas por injeção de dose letal de anestésico no 19º DG. Após a anestesia (tribromoethanol 0,025 mL/g de peso corporal) os cornos uterinos foram cirurgicamente removidos. Realizou-se então a contagem dos fetos viáveis, das reabsorções, das perdas fetais e das malformações macroscópicas (macrossomia, fechamento incompleto de crânio e do abdômen).

A somatória do número total de fetos viáveis e inviáveis (reabsorções, perdas fetais e malformações) permitiu a estimativa do número total de embriões implantados durante a gestação. A diferença entre o número de implantações e de fetos viáveis permitiu estimar a taxa total de perdas gestacionais pós-implantacionais nas fêmeas controle e diabéticas. As reabsorções (ou perdas embrionárias) foram caracterizadas por massas amorfas de tecido nas quais não era possível identificar restos embrionários ou de placenta. Foram caracterizadas como perdas fetais aquelas em que era possível distinguir estruturas fetais e de placenta nas massas de tecido em degeneração.

Placentas e fetos de cada grupo experimental e controle foram pesados para comparação e subdivididos em lotes destinados às técnicas moleculares, bioquímicas e morfológicas (ultraestruturais, histoquímicas e imunohistoquímicas).

3.4 Análises histomorfométricas

Por se tratar de uma estrutura altamente heterogênea, composta por diferentes tipos celulares, a placenta requer a identificação precisa das diferentes regiões que a compõem. Para isso, diferentes técnicas histoquímicas (descritas abaixo) foram utilizadas.

As análises histomorfométricas foram realizadas em imagens capturadas em um microscópio Nikon Eclipse E600, integrado a uma câmera digital DP72 (Olympus), utilizando o software Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA). Para as análises estatísticas utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA).

Para a análise das dimensões placentárias, total e parcial, as placentas foram fixadas em 4% paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 gelado e em methacarn (metanol, clorofórmio e acido acético glacial 6:3:1, v/v), por 24 e 3 horas, respectivamente. Posteriormente, estas amostras foram incluídas em parafina para a obtenção de cortes de 5-µm

de espessura. As avaliações morfométricas das placentas foram realizadas em 12 preparados histológicos para cada grupo, cada um deles representado por 6 animais, totalizando 72 medidas/grupo.

Para as análises da barreira placentária as amostras foram imersas em solução fixadora contendo 2% glutaraldeído e 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,3, acrescida de 2,5 mM de cloreto de cálcio. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 2 horas, desidratadas em uma série crescente de etanol e óxido de propileno e incluídos em resina Spurr. Foram então obtidos cortes semi-finos (1 μm de espessura) e corados pelo Azul de Toluidina. O estudo envolveu 5 animais por grupo experimental. De cada um dos grupos foram selecionadas 30 secções e, de cada uma delas, foram realizadas medidas em 10 áreas de barreira placentária por animal, ou seja a distancia entre o sangue materno e a vasculatura fetal.

3.5 Identificação de colágeno e de células de glicogênio

A coloração pelo sirius red (solução Sirius red F3B [0.5 g] saturado em solução aquosa de ácido pícrico [500 mL] conhecido como Picrosírius, permite identificar com precisão fibras e feixes de colágenos sob luz polarizada. Para isso, cortes de parafina foram desparafinizados em xilol e hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes, seguido por lavagem em água destilada. Em seguida, os cortes histológicos foram corados com solução de Picrosírius (92,93), seguido de lavagem em água corrente e contracoloração com hematoxilina de Mayer. Após desidratação e diafanização, os cortes foram protegidos com lamínulas de vidro.

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) permite identificar glicoproteínas neutras e glicogênio (92,93) e foi utilizada para identificar células de glicogênio presentes na região do espongiotrofoblasto. Após a desparafinização e hidratação dos cortes, estes foram imersos em ácido periódico 1N, por 10 minutos, seguido de lavagem em água destilada. Posteriormente, os cortes foram incubados em reativo de Schiff, por 1 hora, em câmara escura. Seguiu-se com lavagem em água corrente para intensificar a reação. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e protegidos com lamínulas de vidro. Para ambas as técnicas foram utilizadas amostras de 5 animais por grupo experimental.

3.6 Imunolocalização

Após desparafinização e hidratação, cortes de parafina foram submetidos a reações para imunofluorescência. O acesso dos anticorpos aos seus sítios de ligação foi facilitado por digestão enzimática utilizando-se pepsina (Sigma; 1mg/mL em ácido acético 0,5 N). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado por meio de incubação com o soro do animal doador do anticorpo secundário adicionado de solução de 10% albumina sérica bovina (BSA) em tampão fosfato salina (PBS do inglês *phosphate buffered saline*), ambos a temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo primário (anti-colágeno I, III, IV e V - Rockland 1:50 v/v; anti-laminina Sigma 1:100 v/v) foi feita por 12 horas (*overnight*) a 4°C, seguida pela incubação com o anticorpo secundário correspondente, conjugado com o fluoróforo FITC (1:100; Sigma). Os núcleos foram contracorados com DAPI (Sigma) e os cortes protegidos com lamínulas de vidro. Foram utilizadas amostras de 5 animais por grupo experimental.

3.7 RT-PCR em tempo real

As amostras (n = 5) foram armazenadas em solução de *RNA later* (Sigma) até sua utilização. Para a extração do RNA as amostras foram homogeneizadas em um equipamento homogeneizador Precellis® (Bertin Technologies, França), utilizando o reagente de Trizol (Sigma) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

O RNA total extraído das amostras foi armazenado a -80 °C. A quantificação do RNAm foi realizada com a utilização de espectrofotômetro (Epoch – Biotek, USA). Para evitar contaminação e interferência deDNA nas reações, todas as amostras foram incubadas com DNase I (Invitrogen, USA) por 15 minutos à temperatura ambiente antes da etapa da transcrição reversa. Para a esta etapa utilizou-se o *Kit Affinity Script QPCR cDNA Synthesis* (Stratagene, USA). Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 μg de RNA total de cada amostra, *random primers* e a enzima transcriptase reversa. Posteriormente, as amostras de cDNA foram diluídas 1:5 em água estéril (Sigma) e armazenadas a -20 °C.

A reação de PCR *real time* foi realizada em um volume total de 20 μL, contendo o cDNA, o par de primers e *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Life Technologies/Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram as seguintes: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min, realizadas no equipamento

StepOnePlus (Life Technologies/Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram analisadas em duplicata.

A eficiência dos pares de *primers* foi calculada utilizando-se diluições seriadas de uma amostra controle (3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 ng de cDNA). O valor de cada Cq foi plotado em relação ao logaritmo de cada diluição do *template*. Foi obtida uma reta e um valor de a (*slope*) em y=ax+b utilizado para o cálculo da eficiência = $10^{-1/a}$. Apenas valores de eficiência entre 1,8 e 2,2 foram aceitos (eficiência 100% = 2,0).

Para a quantificação relativa dos transcritos foram previamente testados genes de referência, *Ywhaz, GAPDH, Ciclofilina A,* em todas as amostras. O gene Ywhaz foi o que apresentou menor variação em sua expressão entre os grupos.

O método de ΔΔCt (*Comparative Ct Method*) foi utilizado considerando que a diferença entre as eficiências dos genes alvo e endógeno era inferior a 10%. As curvas de *melting* obtidas evidenciaram um único produto de amplificação, confirmando a especificidade e a qualidade dos *primers* (94).

Tabela 1: Primers utilizados no qPCR

Gene	*Primers* Forward e Reverse	Genbank #
Colágeno tipo I, alfa 1 (*Col1a1*)	F: ATGGCCAACCTGGTGCGAAAGG R:ACCAACGTTACCAATGGGGCCG	NM_007742.3
Colágeno tipo III, alfa 1 (*Col3a1*)	F: AACCAGGAGCCAGTGGCCATA R: TCACCACGATCACCCTTGCCAC	NM_009930.2
Colágeno tipo V, alfa 1 (*Col5a1*)	F: CCGATGGCAAGTGGCACCGAAT R: TGGTCACTGCGGCTGAGGAACT	NM_015734.2
YWHAZ	F: GAAGCCACAATGTTCTTGGCCCAT R: AAACCAACAGAGACTTGGAAGCAC	NM_011740.2
GAPDH	F: TCTGAGGGCCCACTGAAG R:AGGGTTTCTTACTCCTTGGAGG	NM_008084.2
Ciclofilina A	F: GCCGATGACGAGCCCTTG R: TGCCGCCAGTGCCATTATG	AF_171073.1

3.8 Zimografia

Os resultados obtidos pela imunocitoquímica e qPCR indicaram a ocorrência de alterações na remodelação da MEC, processo mediado por MMPs. Para comprovar essa hipótese, realizou-se análises da atividade destas moléculas pela técnica de zimografia em gel.

Para tal, placentas foram coletadas e congeladas em nitrogênio liquido até o momento do uso. As amostras (n = 5) foram então homogeneizadas em um equipamento Precellis® utilizando-se tampão de lise e coquetel de inibidores de proteaseses (*Halt™ protease inhibitor cocktail*, Thermo Scientific, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000 g a 4°C por 30 min) e o sobrenadante coletado. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA, 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina, Pierce Inc., MA, USA). O volume de amostra carregado em cada poço (25 µg) foi estabelecido com base nos dados obtidos da quantificação proteica.

Após eletroforese, o gel foi lavado em solução de 2,5% Triton X-100 em ddH_2O, para retirar o dodecil sulfato de sódio (SDS) e promover a renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado por 20 horas a 37°C em solução tampão reveladora (50 nM Tris-HCl, pH 8,8; 5 nM $CaCl_2$ e 0,02 NaN_3). Os géis foram então corados com 0,1% de azul de Comassie e descorados em solução de metanol, ácido acético glacial e água destilada (4,5 :1: 4,5; v/v).

As bandas de degradação enzimática obtidas na zimografia foram comparadas por densitometria do gel utilizando o programa de domínio publico imageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/). As densitometrias obtidas foram normalizadas e expressas como porcentagem da densitometria das bandas de soro fetal bovino (controle interno). Os experimentos foram realizados em triplicata. Amostras contendo EDTA, substância que atua como quelante de metais pesados, como o zinco, e consequentemente possui a capacidade de inativar as MMPs, foram utilizadas para confirmar se as bandas de lise de fato resultaram da ação das MMPs.

3.9 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos a análises estatísticas utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA), utilizando o teste ANOVA, seguido dos pós-testes de comparações múltiplas Tukey's. Foram considerados significativos valores de $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros fisiopatológicos do modelo

O sucesso de indução do diabetes pela administração de aloxana intravenosa foi de aproximadamente 70-80%. Altos níveis de glicemia, glicosúria e diminuição do peso corporal total foram identificados nas fêmeas de ambos os grupos 30-50D e 90-110D não havendo diferença entre os dois grupos. A tabela 2 mostra os valores encontrados ao final da gestação.

Tabela 2: Parâmetros Fisiopatológicos ao final da gestação

	Controle	30-50 D	90-110 D
Glicemia (mg/dL)	117,2 ± 38,58	572,9 ± 25,84a	554,9 ± 95,90a
Glicosúria (mmol/L)	nd	≥ 278	≥ 278
Peso corporal (g)	62,17 ± 5,70	47,69 ± 6,88a	51,77 ± 6,02a

a = p<0,001 x grupo controle
nd: não detectado

4.2 Ciclo estral

A análise citológica dos esfregaços vaginais pela técnica de Shorr dos animais controle mostrou um perfil compatível com aquele já descrito na literatura (2,3). A fase de **proestro** (Figura 2A) apresentou células epiteliais basais e intermediárias, caracterizadas por núcleos com cromatina frouxa e citoplasma basófilo. A fase de **estro** (Figura 2B) apresentou típicas células superficiais cornificadas, predominantemente anucleadas, coradas em tons avermelhados. Na fase seguinte, o **metaestro** (Figura 2C) o esfregaço foi caracterizado pela presença de células superficiais (queratinizadas) ao lado de células intermediárias, e pelo acúmulo de leucócitos polimorfonucleares. O **diestro** (Figura 2D) foi marcado essencialmente pela presença de muco, grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares e poucas células basais.

Durante a primeira etapa de avaliação os esfregaços foram realizados entre 10 e 20 dias após a indução do diabetes. Neste período, todos os animais acompanhados apresentavam alterações no ciclo estral, em menor ou maior grau. Aproximadamente 93% destes animais apresentavam alterações no perfil temporal das fases do ciclo evidenciadas pelo esfregaço vaginal.

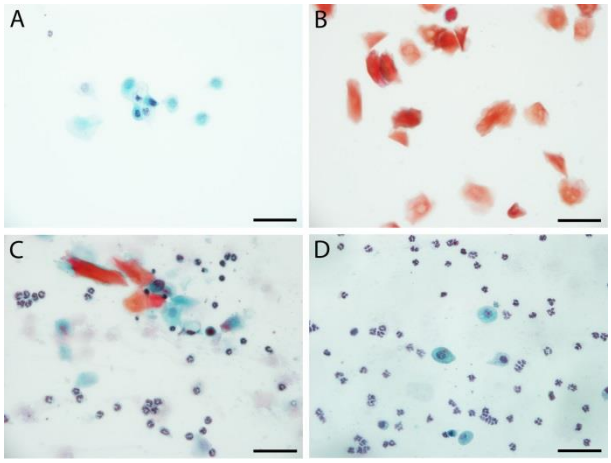

Figura 2: Características morfológicas do ciclo estral do grupo controle. A) Proestro: predominância de células epiteliais intermediarias. Duração aproximada: 12h. B) Estro: presença exclusiva de células epiteliais superficiais, Duração média: 24h. C: Metaestro: caracteriza-se pela presença de células epiteliais superficiais e intermediarias, polimorfonucleares neutrófilos e muco. Duração: 10h. D) Diestro: caracteriza-se pela predominância de leucócitos polimorfonucleares, muco e poucas células basais, Duração: de 54-57h. Barra = 30 µm

A figura 3 mostra uma sequência de esfregaços vaginais coletados de um mesmo animal, durante 10 dias consecutivos após 10-20 dias da indução do diabetes. Durante este período notamos o alongamento da fase estro (Figura 3D-F) e de metaestro (G-H).

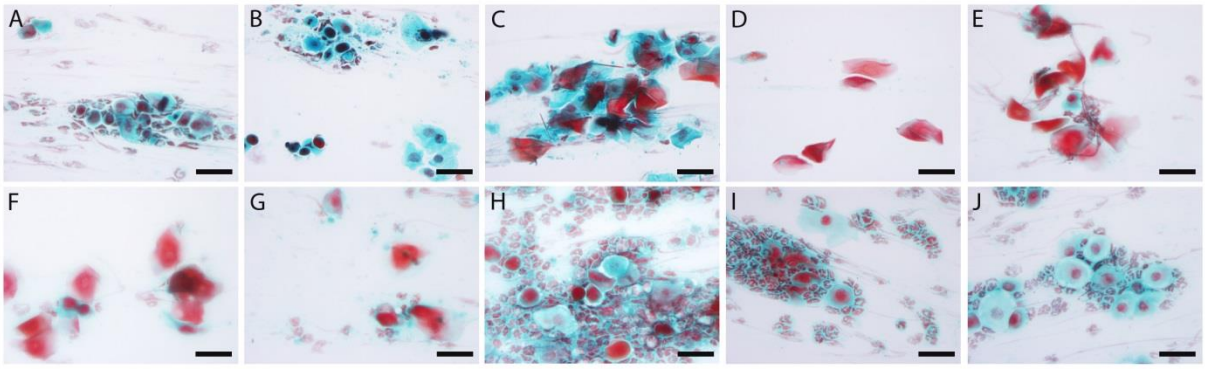

Figura 3: Imagens de esfregaços vaginais obtidos diariamente de um mesmo animal por 10 dias consecutivos, após 10 dias da indução do diabetes. Neste animal foi possível detectar a ocorrência de alongamento da fase de estro, que se mantem durante 24 horas ao invés das 12 horas classicamente descrita (D-F). A fase de metaestro apresentou 36horas ao invés das 10horas. (G-I). Diestro (A, B e J) Proestro (C). Barra = 20µm.

A figura 4 apresenta o perfil de outro animal que apresentou, durante o período de avaliação (10 dias), variações no perfil temporal e morfológico da fase de diestro (Figura 4).

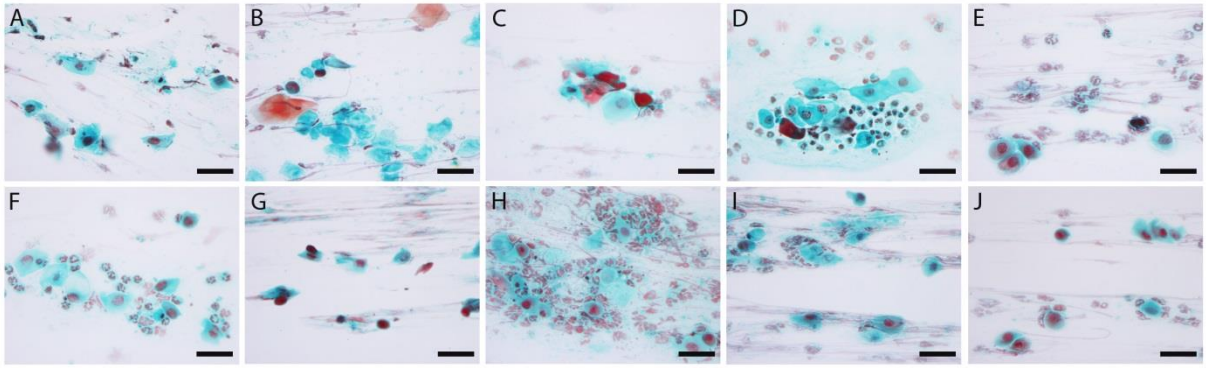

Figura 4: Imagens de esfregaços vaginais obtidos diariamente de um mesmo animal por 10 dias consecutivos, após 10 dias da indução do diabetes. As imagens demonstram que ao longo dos 10 dias os esfregaços mantinham as características citológicas da fase de diestro revelando o alongamento dessa fase do ciclo estral. Barra = 20µm.

Além de alterações na duração das fases do ciclo estral, observamos também nos esfregaços: i) metacromasia (Figura 5A), comum em quadros inflamatórios, decorrente da variação de pH; ii) aumento de muco (Figura 5A) e iii) presença de flora vaginal (Figura 5B), que em camundongos não é comum. Dentre os animais avaliados nesta primeira fase 7% mantiveram, durante todo o período, esfregaços com características de diestro, indicando a interrupção do ciclo estral ou anestro (Figura 5C).

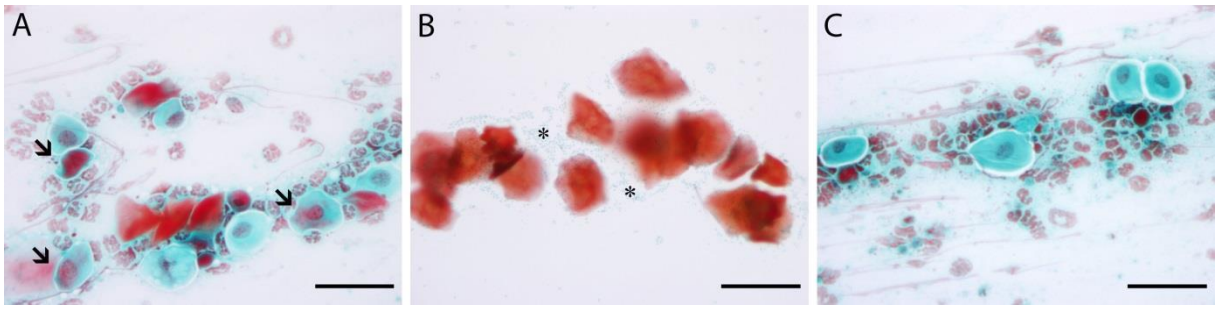

Figura 5: Alterações do ciclo estral nos animais diabéticos após 10 dias da indução do diabetes. A) Metacromasia (seta). B) Flora vaginal (*). C) Quadro atrófico, caracterizado pela presença constante ao longo do período estudado de células epiteliais profundas, muco e polimorfonucleares. Barra = 30µm.

A segunda etapa de avaliação dos esfregaços ocorreu entre 40 e 50 dias após a indução do diabetes. Os esfregaços apresentaram marcantes alterações no padrão clássico do ciclo estral. A principal delas foi o prolongamento da fase de diestro (Figura 6) presente em 64% dos animais analisados, característica que indica possível progressão para o anestro.

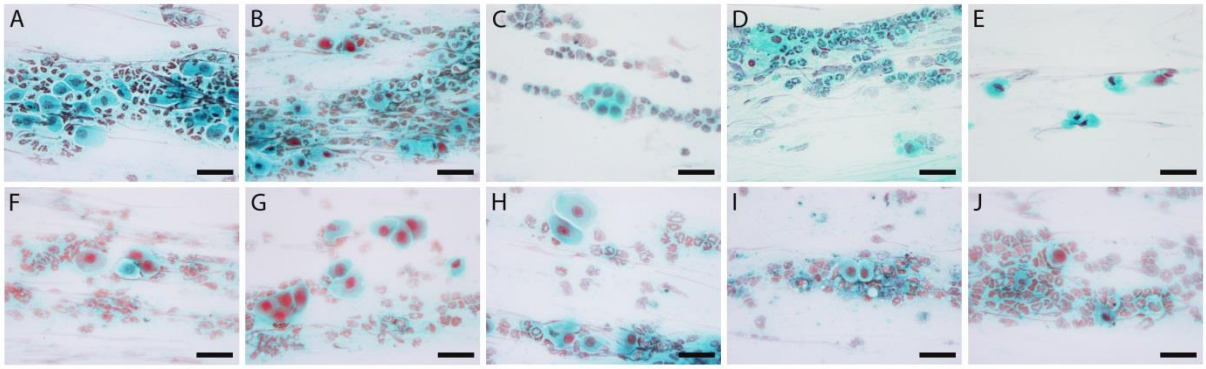

Figura 6: Sequência de esfregaços vaginais coletados ao longo de 10 dias, após 40 da indução da diabetes. Nas imagens nota-se a presença constante de células epiteliais profundas, muco e leucócitos polimorfonucleares que identificam um quadro tipicamente atrófico. Barra = 20µm.

4.3 Perfil reprodutivo

Os dados obtidos de animais acasalados após 30-50 e 90-110 dias da indução do diabetes mostram, que o número de implantações no grupo diabético foi 15% (12,63±2,07) e 14% (12,89±3.69) menor, respectivamente, quando comparados ao controle (14,94±1.59). Além disso, o número de reabsorções (perdas embrionárias), mortes fetais e malformações macroscópicas estavam aumentadas nos grupos diabéticos (Figura 7). O diabetes de curta duração promoveu perdas embrionárias, enquanto o de longa duração, mortes feitais e malformações.

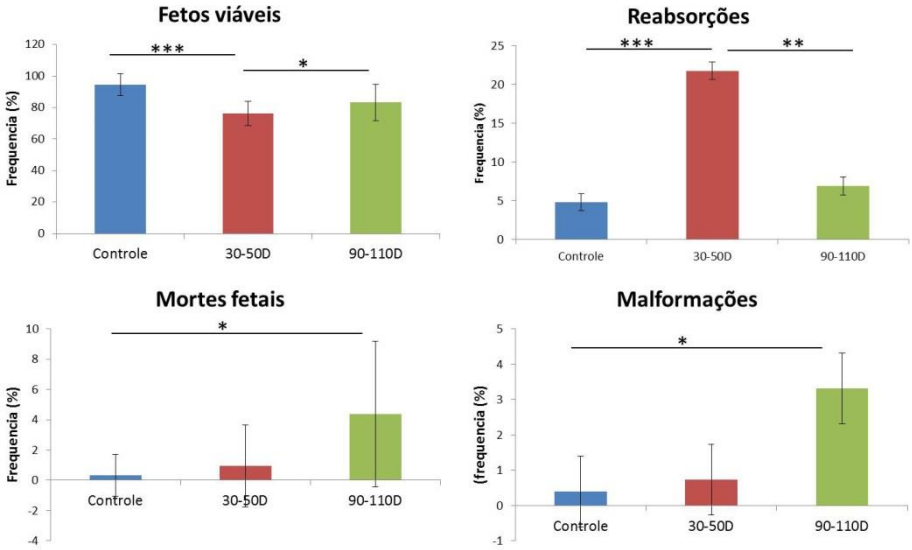

Figura 7: Perfil reprodutivo de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. Note, que embora no grupo 30-50D a porcentagem de fetos seja menor, a porcentagem de reabsorções foi maior quando comparadas ao controle e 90-110D. No grupo 90-110D observa-se maior índice de mortes fetais e malformações macroscópicas quando comparados aos grupos controle e 30-50D. Diferenças estatisticamente significantes estão representadas por *p<0,05 *** p<0,001

4.4 Perfil gestacional

As placentas do grupo de 30-50D pesavam entre 70 e 110 mg em 87% das amostras. Esses valores são semelhantes ao grupo controle, no qual 89% das placentas apresentavam similar faixa de peso. No grupo 90-110D,entretanto, apenas 68% das placentas pesavam entre 70 e 110 mg enquanto apenas 31% pesavam acima de 110 mg (Figura 8A).

No grupo controle 98% dos fetos apresentavam peso entre 1 e 1,6 g. Entretanto, 89,5% dos fetos diabéticos do grupo de 30-50D estavam abaixo do peso, pesando entre 0,6 e 1 g. No grupo de 90-110D, apenas 42% apresentavam esta faixa de peso, e os 58% restante pesavam acima de 1g. (Figura 8B).

Embora as fêmeas do grupo 90-110D tenham apresentado valores de glicemia, glicosúria e peso semelhantes, cerca de um terço delas , possuíam pesos placentários e fetais semelhantes aos encontrados nas fêmeas controles, indicando que sofreram algum tipo de adaptação .

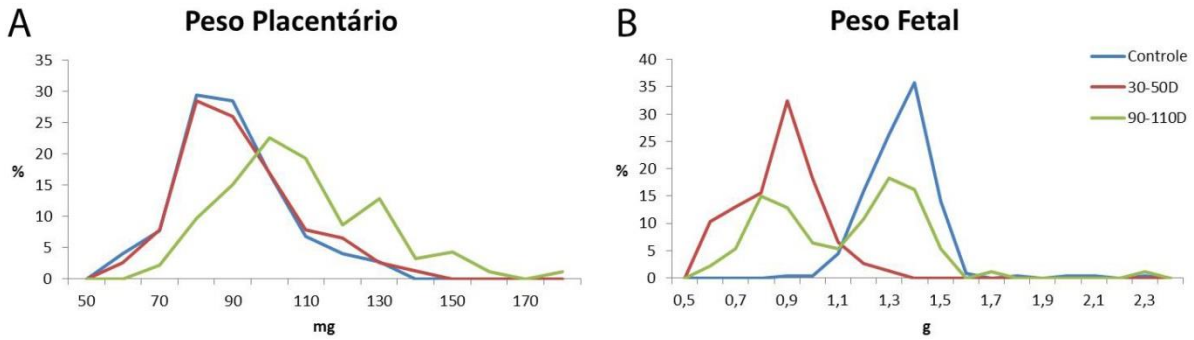

Figura 8: Gráfico de distribuição de peso de placentário (A) e fetal (B) de fêmeas sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. O gráfico A demonstra que 69% das placentas do grupo 90-110D tem peso entre 70-110mg, contrastando com 89% das controles e 87% de 30-50D. O gráfico B mostra que 89% dos fetos de 30-50D apresentam peso menor do que o observado no grupo controle. No grupo de 90-110D entretanto, apenas 42% dos fetos apresentam peso menor do que aqueles do grupo controle.

A proporção entre o peso fetal e o peso da placenta mostrou uma redução em ambos os grupos diabéticos 30-50D e 90-110D (Figura 9). Em todos os grupos foram encontradas correlações positivas entre os pesos placentários e fetais (Controle: r = 0,08614; 30-50D: r = 0,2711; 90-110D: r = 0,0488).

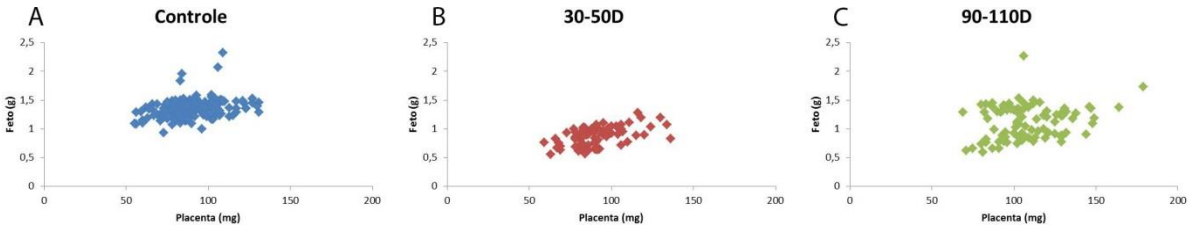

Figura 9: Correlação entre peso fetal e placentário de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução.

4.5 Morfologia e morfometria da placenta

As placentas diabéticas apresentaram alterações caracterizadas pelo aumento e desorganização da região da zona juncional (ZJ), redução da camada do labirinto (L) (Figura 10A-C), bem como, dilatação de vasos sanguíneos fetais (Figura 10D-F), quando comparadas aos controles. A reação histoquímica do PAS mostrou aumento no número e volume das células de glicogênio que invadem o labirinto, acompanhadas por células do espongiotrofoblasto em ambos os grupos diabéticos (Figura 10G-I).

A área total das secções de placenta foi maior no grupo 90-110D ($p < 0,01$) do que no grupo de controle e 30-50D (Figura 11A). Além disso, a avaliação histomorfométrica revelou uma diminuição progressiva e significativa na proporção da área da região do labirinto com a duração do diabetes (30-50D, 90-110D e 30-50D *vs.* 90-110D; $p<0,001$) (Figura 11B). Não houve diferenças significativas na espessura da barreira placentária entre os grupos.

4.6 Análise dos componentes da MEC

A coloração pelo Picrosírius, observada sob luz polarizada, revelou um aumento na deposição dos colágenos fibrilares na região do labirinto em ambos os grupos diabéticos (Figura 12).

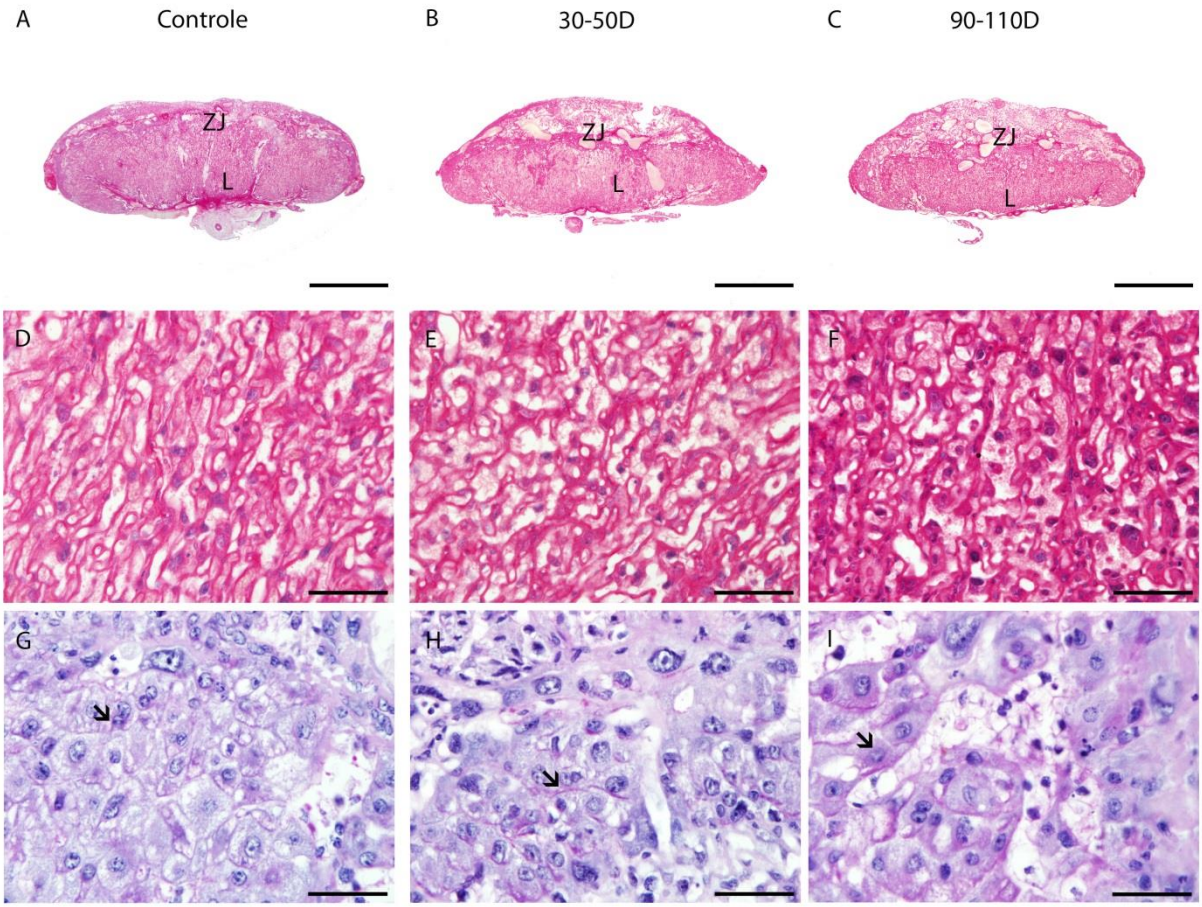

Figura 10: Morfologia da placenta. (A-C) Visão panorâmica de placentas representativas de todos os grupos estudados. Região do labirinto (L) Zona Juncional (ZJ). Notar a redução do labirinto nas placentas diabéticas e o aumento da zona juncional (B-C). (D-F) Maior aumento da região do labirinto mostrando a dilatação dos capilares fetais e dos espaços preenchidos por sangue materno (Picrosirius). (G-I) Maior aumento da região da zona juncional mostrando células de glicogênio (seta) (PAS). Barras = 1000 μm A-C e 100 μm D-I.

4.6.1 Imunolocalização

As reações de imunolocalização mostraram os colágenos tipo I, III e V, depositados ao redor dos vasos sanguíneos e também dispersos em toda a região do labirinto (Figura 12).

A distribuição dos colágenos I, III e V foi afetada pelo diabetes de forma dissimilar entre os grupos. No grupo 30-50D observou-se um aumento na deposição de colágeno I enquanto no grupo 90-110D a imunorreação foi semelhante àquela observada no grupo controle (Figura 12). Um discreto aumento da imunorreação para o colágeno III foi observada no grupo 30-50D enquanto no grupo 90-110D o aumento da imunomarcação foi mais expressivo, quando comparadas com o controle (Figura 12). A imunorreação para o colágeno V aumentou em ambos os grupos diabéticos, quando comparadas com o controle (Figura 12).

É importante relembrar, que apenas os vasos maternos são providos de lamina basal. Portanto, a imunolocalização para o colágeno tipo IV e para a laminina identifica apenas a vasculatura materna. A imunofluorescência mostra que o diabetes promove uma diminuição na rede vascular em ambos os períodos experimentais, sobretudo no grupo 90-110D. Ao mesmo tempo mostra um aumento da deposição do colágeno tipo IV na membrana basal da rede vascular de ambos grupos diabéticos.

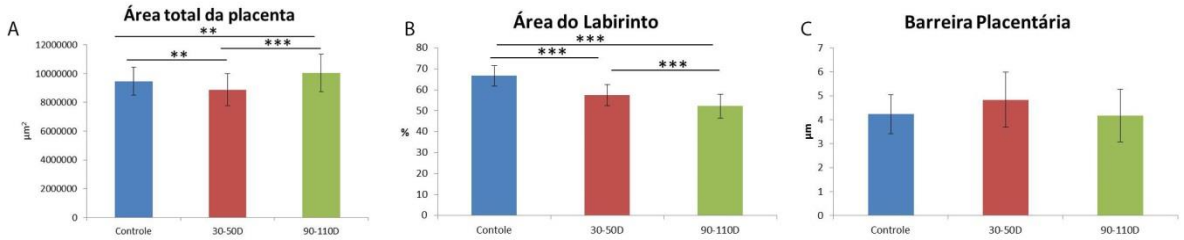

Figura 11: Histomorfometria placentária de animais controle e após 30-50 e 90-110 dias de indução do diabetes. (A) Área total da placenta. (B) Área de labirinto. (C) Barreira placentária. Asteriscos representam valores significativamente: ** p<0,01 *** p<0,001.

4.6.2 Expressão e degradação das moléculas da MEC

A composição da MEC é mantida pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação de seus componentes. Para compreender os mecanismos pelos quais o diabetes afeta a composição de MEC placentária, a expressão do RNAm do *Col1a1*, *Col3a1* e *Col5a1* e a atividade das gelatinases de MMP2 e MMP9 foram avaliadas, respectivamente, por qPCR e zimografia em gel.

4.6.2.1 Expressão gênica avaliada por RT-PCR

As análises por qPCR revelaram aumento na expressão do RNAm de *Col1a1* no grupo 30-50D (1,88 ± 0,6; p<0,01) a qual foi reestabelecida a valores semelhantes ao controle (0,99 ± 0,2) no grupo 90-110D (1,43 ± 0,28) (Figura 13A).

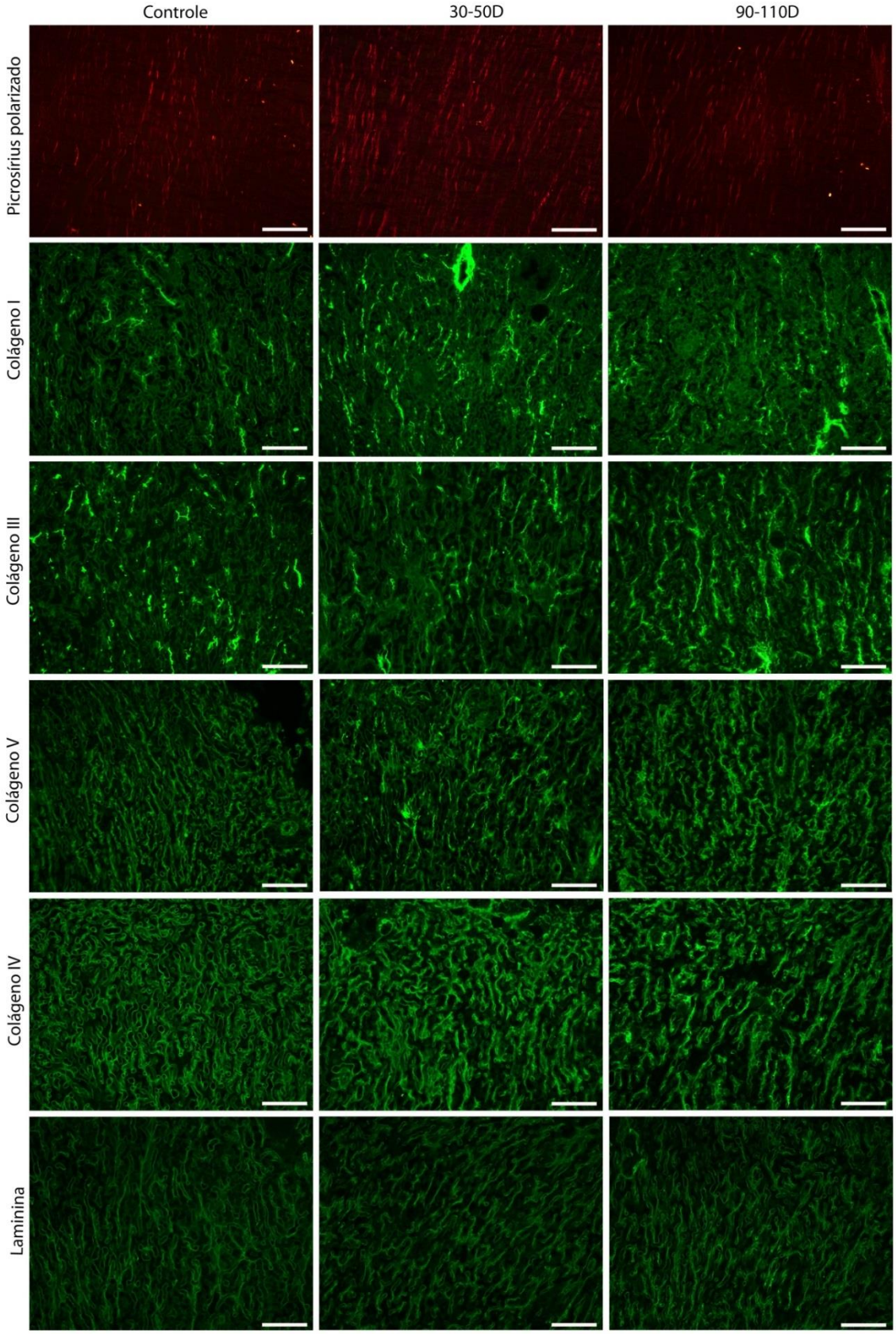

Figura 12: Coloração pelo picrosirius e imunofluorescência de componentes da MEC. As figuras mostram a região do labirinto de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. Barra = 50µm.

Em contraste, a expressão de RNAm de *Col3a1* não apresentou diferença estatística significante entre os grupos experimentais e controle (30-50D: 2,55 ± 2,05, 90-110D: 1,6 ± 0,31e controle: 1,0 ± 0,23) (Figura 13B). Entretanto, quando as amostras do grupo 30-50D foram avaliadas individualmente observou-se dois perfis de expressão do *Col3a1*: 57% dos animais apresentou expressão semelhante (1,05 ± 0,26) ao grupo controle (1,19 ± 0,22) enquanto 43% apresentou um aumento na expressão deste colágeno (4,56 ± 1,4; p<0,001) em relação ao controle (Figura 13).

Os níveis de RNAm *Col5a1* estavam diminuídos no grupo 30-50D (0,63 ± 0,28), já o grupo 90-110D (1,04 ± 0,3) apresentou valores semelhantes ao controle (1,19 ± 0,28) (Figura 13C).

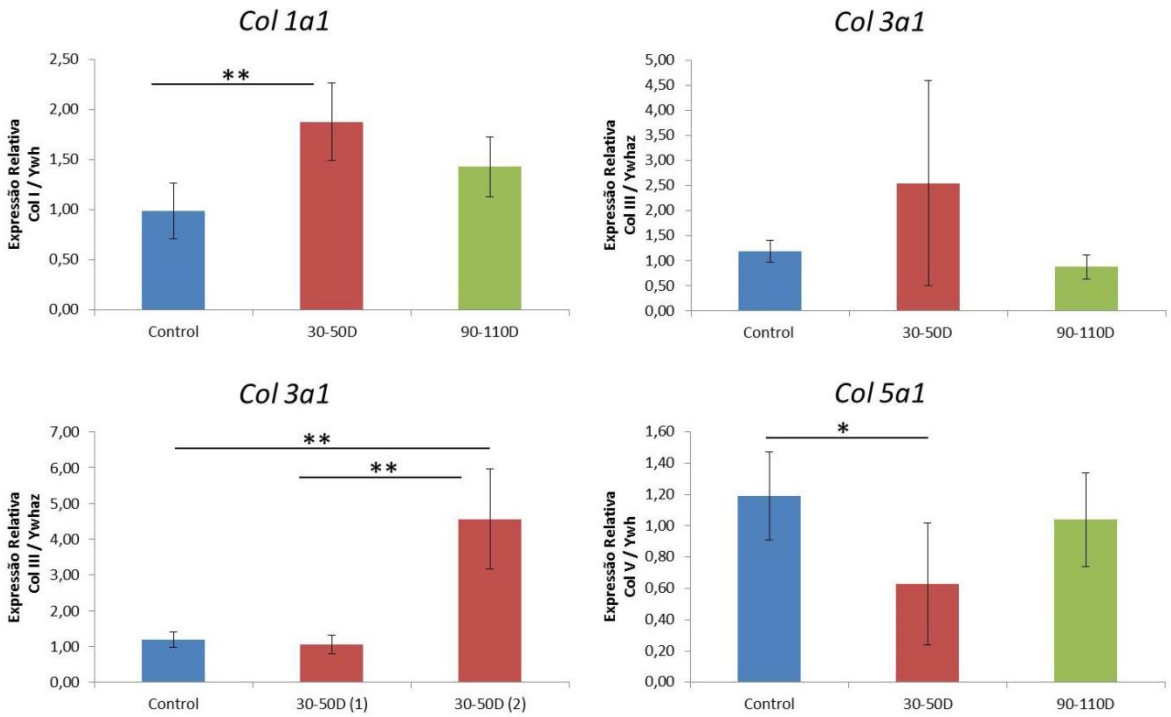

Figura 13: Expressão gênica de componentes da MEC avaliada por qRT-PCR em placentas dos grupos de animais acasalados sem indução de diabetes (controle) e após 30-50 e 90-110 dias de indução. Asteriscos representam valores significativamente diferentes: *p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001

4.6.2.2 Atividade das MMPs

A técnica de zimografia em gel revelou aumento da atividade de MMP2 apenas no grupo 90-110D (p<0,001), enquanto a atividade da metaloproteinase MMP9 diminuiu apenas no grupo 30-50D (p <0,05), em relação ao controle (Figura 14).

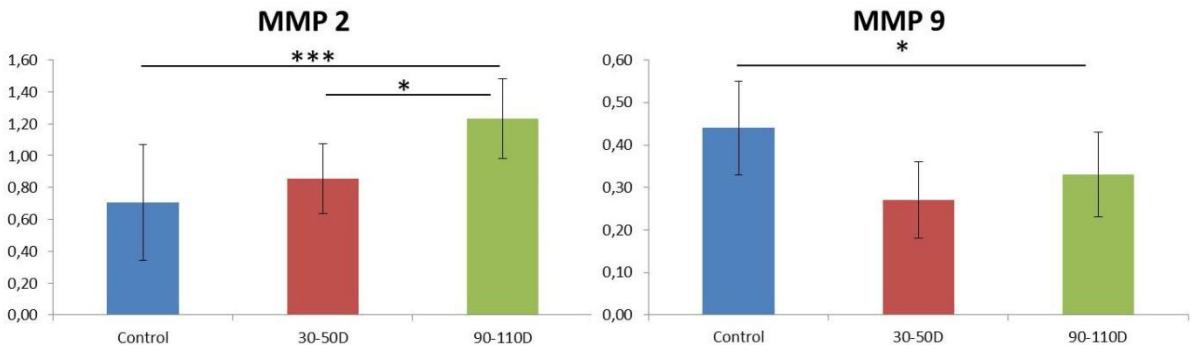

Figura 14: Avaliação quantitativa dos ensaios de zimografia em gel para MMP2 e MMP9 realizados em placentas dos grupos experimentais sem indução de diabetes (controle) e após 30 e 90 dias de indução. Os asteriscos identificam valores significativamente diferentes: *** $p<0,001$ * $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros fisiopatológicos

O modelo animal utilizado neste estudo foi delineado para investigar a influência da progressão do diabetes no desenvolvimento de complicações reprodutivas (89,90). As fêmeas diabéticas apresentam características fisiopatológicas clássicas do *Diabetes Mellitus tipo 1* e foram capazes de reproduzir e manter a gestação sem tratamento com insulina por um longo período de tempo (até 110 dias após a indução do diabetes) (89,90). Os resultados obtidos nesta tese demonstraram que as fêmeas diabéticas são caracterizadas por ciclo estral alterado, redução da relação peso placenta-feto, diminuição do labirinto em relação à área total da placenta, alterações na expressão gênica e na deposição de componentes da matriz extracelular, bem como na atividade de MMPs. Todavia, esses parâmetros foram diferencialmente modulados de acordo com a progressão do diabetes. No grupo de 30-50D o diabetes promoveu complicações como perdas embrionárias, enquanto o grupo de 90-110D desenvolveu mortes feitais e malformações na prole. Variação individuais também foram notadas, particularmente, na expressão do *Col3a1* no grupo 30-50D e nos pesos fetais no grupo de 90-110D.

5.2 Ciclo estral

Desde a década de 50 reconhece-se o fato de que pacientes diabéticas sofrem atraso em sua maturidade sexual, encurtamento do período fértil e menopausa precoce, provavelmente, decorrentes de distúrbios no eixo hipotálamo-hipófise-ovário (95).

No presente estudo, a avaliação dos esfregaços vaginais submetidos à técnica de Shoor (1) mostrou que os animais diabéticos apresentam alterações do ciclo estral. Dentre as modificações encontradas, destacam-se: (i) alterações no perfil temporal das fases do ciclo como alongamentos de estro, metaestro e diestro; (ii) metacromasia e (iii) presença de flora vaginal.

O alto conteúdo de glicose na urina e alterações significativas na resposta imunológica são fatores sugeridos para explicar a predisposição a infecções do trato urinário em mulheres com diabetes mellitus (96). Esta suscetibilidade, proporcional à duração e severidade da diabetes, é relacionada a defeitos na mobilidade, quimiotaxia e fagocitose leucocitária (96). Embora não tenhamos avaliado detalhadamente a composição da flora vaginal presente em nossos animais, é possível que decorram de mecanismos semelhantes.

Há evidências de que animais diabéticos apresentam diminuição da função hipotálamo-hipófise, caracterizada por alterações na resposta ao estímulo pelo GnRH associada a baixos níveis de FSH e LH (97). Coerentemente, neste estudo encontramos 64% dos animais diabéticos com esfregaços vaginais característicos de anestro.

Ratas diabéticas, induzidas por aloxana e estimuladas por gonadotropinas durante o período pré-púbere, não ovulam e não apresentam picos de LH. O tratamento com insulina, no entanto, é capaz de restabelecer os níveis hormonais e promover a ovulação (98). Alterações na esteroidogênese, que inclui diminuição na produção de progesterona e estrogênios (62–64), parecem estar relacionadas com a diminuição da secreção de GnRH (65) e/ou de gonadotrofinas. Relaciona-se também com a redução no número de receptores para esses hormônios, nas células do ovário, ou ainda com a afinidade destes hormônios aos seus receptores (62).

A ação de feedback dos esteróides sexuais é inibida em ratas portadoras de diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina, o que poderia explicar tanto a perda de ciclicidade estral como a redução da sensibilidade da hipófise ao hormônio luteinizante (99).

Coiro et al. (100) demonstraram a existência de uma correlação negativa entre a duração do diabetes e o pico de LH. Mulheres que sofrem de diabetes do tipo 1 por 10 a 20 anos apresentaram redução no pico de LH quando comparados a mulheres que apresentam diabetes por 3 a 9 anos, as quais não apresentaram alterações deste hormônio.

Mulheres com diabetes do tipo 1 podem apresentar problemas menstruais, como ciclos e períodos menstruais alongados, antes dos 30 anos de idade, além de histórico de menarcas tardias, menopausa precoce e menor número de gestações (58). A menopausa precoce, e consequente diminuição da vida reprodutiva, são complicações importantes do diabetes do tipo 1, e se relacionam com a hiperglicemia prolongada e/ou outras complicações decorrentes dos efeitos de longo prazo desta doença (56). Nossos dados corroboram a literatura demonstrando que as alterações encontradas nos esfregaços de camundongos diabéticas deste estudo estão diretamente relacionadas com a duração do diabetes.

5.3 Perfil reprodutivo

Lesões placentárias e complicações gestacionais em modelos de roedores diabéticos são muito semelhantes àquelas encontradas em mulheres diabéticas (72,101). Recentemente, a análise do proteoma e transcriptoma da região vascular de placentas humanas e de camundongos, revelou um alto grau de semelhança entre elas (102) ressaltando a importância

de modelos de camundongo para a melhor compreensão do efeito de doenças sobre o desenvolvimento da placenta humana.

Nossos resultados mostraram que o diabetes de curto prazo (30-50D) está associado com altas taxas de perdas embrionárias e restrição de crescimento intrauterino, na maioria dos fetos. Em contraste, o diabetes de longa duração, 90-110D promoveu outros tipos de complicações, tais como malformações e mortes fetais, além de significativa restrição de crescimento intrauterino.

Malformações são uma das complicações mais comuns em gestações de mulheres portadoras de diabetes tipo 1 (103). A ocorrência de malformações é associada com um limiar de valor de glicemia em camundongos (104) e seres humanos, particularmente no início da gestação (105,106). Embora a taxa de malformações em nosso estudo tenha sido menor do que o descrito na literatura, ainda assim foi correlacionada com a progressão do diabetes, corroborando estudos clínicos (107,108).

Além disso, estudos anteriores realizados neste modelo de diabetes por Favaro e colaboradores (89,90) mostraram que, a decidualização e a composição de sua MEC, são alteradas nas fêmeas diabéticas de 90-110D, mas não naquelas com duração mais curta do diabetes (50-70D) (90). Do mesmo modo, no presente estudo, taxas elevadas de malformações foram encontradas apenas no grupo de 90-110D. A associação dos resultados destes dois estudos sugere que deficiências na decidualização durante o início da gestação podem contribuir para o desenvolvimento de malformações embrionárias nesse modelo de diabetes.

5.4 Perfil gestacional

Modelos de diabetes tipo 1 promovidos por alterações genéticas ou induzidos quimicamente em camundongos são caracterizados por fetos com baixo peso e placentas com peso normal ou mais pesadas (88,109–111). Nosso modelo acrescenta novas informações a esse tema revelando, que as alterações no peso fetal e placentário ocorrem de forma tempo-dependente. Esse resultado indica que as discrepâncias no peso das placentas descritas em diferentes estudos podem ser consequência da progressão do diabetes decorrente da diversidade de protocolos adotados nos experimentos.

Enfatizamos que, diferentemente de estudos anteriores, no presente estudo os dados foram analisados por meio da distribuição de frequência, o que permitiu uma detecção mais detalhada da diversidade de efeitos promovidos pelo diabetes nos pesos fetais e placentários.

Por meio dessa abordagem verificamos que o peso placentário, por si só, não é suficiente para indicar alterações no desenvolvimento fetal, pois, enquanto a maioria dos fetos estava abaixo do peso no grupo 30-50D, os pesos placentários desse grupo foram semelhantes aos do grupo controle. Adicionalmente, o exame detalhado das placentas do grupo 30-50D mostrou, que modificações estruturais estavam associadas às alterações em seu peso, indicando a importância de múltiplas análises para uma adequada avaliação da funcionalidade da placenta. Apesar da eficiência placentária (peso fetal *vs*. peso placentário) ter sido substancialmente reduzida nos grupos diabéticos, o peso placentário foi correlacionado positivamente com o peso fetal. Entretanto, o aumento no peso das placentas no grupo 90-110D associada a fetos com pesos semelhante ao controle sugere, que o aumento do peso placentário pode contribuir para resgatar o desenvolvimento fetal.

5.5 Morfologia placentária

As placentas diabéticas foram caracterizadas por diminuição da região do labirinto em relação à área total da placenta, alterações na expressão do RNAm e na deposição de componentes da matriz extracelular, bem como na atividade das MMPs. Importantemente, esses parâmetros também foram diferencialmente modulados pela progressão do diabetes.

A zona de labirinto é o sítio de absorção de nutrientes para o feto e aumenta continuamente durante a gestação para acomodar a demanda metabólica, particularmente, no último período gestacional (112). Em gestações diabéticas, os resultados adversos, incluindo a restrição de crescimento intra-uterino e malformações, também têm sido associados a distúrbios no fluxo sanguíneo placentário e/ou na troca de nutrientes e oxigênio entre a mãe e feto (113). Neste contexto, nossos dados destacam uma significante redução do labirinto que em conjunto com as alterações observadas na citoarquitetura e composição da MEC, podem contribuir para alterar as interações materno-fetais e o fluxo sanguíneo local, tendo como consequência, a restrição no crescimento fetal. Estes achados também foram diretamente relacionados com da duração do diabetes.

Estes achados não descatam ou minimizam o papel que alterações na expressão de transportadores de glicose e de aminoácidos e na transferência de nutrientes podem desempenhar na gênese das complicações diabéticas na placenta e no feto (114–116).

5.6 Matriz extracelular

Sabe-se que a MEC é reorganizada durante a formação da placenta (83,117). Estudos *in vitro* de células trofoblásticas de camundongo mostraram que a tensão de oxigênio e os níveis de glicose regulam a expressão de moléculas de MEC. Adicionalmente, níveis elevados de glicose modulam o RNAm de *Col1a1*, *Col3a1* e *Fn1* (117). Portanto, é válido pressupor que, a modulação da expressão destes colágenos em placentas diabéticas, tal como observado nessa tese, assim como o aumento dos níveis de fibronectina demonstrado por outros autores (83,84), decorram dos efeitos da hiperglicemia nas células trofoblásticas.

Resultados obtidos em uma linhagem de células trofoblásticas humanas cultivadas em condições de níveis elevados de glicose mostram alterações na expressão do proteoglicano perlecam, na atividade enzimática da MMP2 e MMP9 e nos níveis dos inibidores de metaloproteases tecidual (TIMP) 1 e TIMP2. Alterações também foram detectadas na expressão de citocinas pró-inflamatórias e de fatores angiogênicos (118).

Por meio de nosso estudo *in vivo* foi possível observar a temporalidade das alterações da MEC. No grupo 30-50D a expressão de RNAm e deposição do colágeno tipo I estavam aumentadas, concomitante a diminuição na atividade da MMP9. No grupo 90-110D, entretanto, embora não tenha havido alteração na expressão do RNAm, a deposição dos colágenos III e V, bem como a atividade da MMP2 estavam aumentadas.

No grupo de 30-50D os níveis de expressão do colágeno tipo III não apresentaram diferenças estatísticas. Porém, nesse grupo dois conjuntos diferentes de amostras foram detectados: um grupo de amostras foi semelhante ao controle, enquanto em outro, a expressão do colágeno III estava aumentada de forma significativa. Por outro lado, no grupo 90-110D a expressão desse colágeno foi semelhante ao controle, enquanto sua deposição estava aumentada.

Os níveis de expressão do colágeno tipo V foram diminuídos em 30-50D, porém sua deposição foi aumentada na região do labirinto em ambos os grupos diabéticos. Trabalhos anteriores do LBR/MEC (3) também mostraram ausência de correlação entre a deposição de algumas moléculas da MEC e a expressão de seus RNAm nos tecidos uterinos. Esses resultados aparentemente contraditórios decorrem, provavelmente, da complexidade e da velocidade do processo de síntese e degradação dessa família de moléculas, particularmente, em estruturas com alto grau de remodelação como é o endométrio especialmente, durante a gestação. Coletivamente, nossos resultados indicam que o diabetes interfere na MEC placentária, afetando pelo menos dois mecanismos (i) a expressão do RNAm de seus componentes e (ii) a atividade de enzimas de clivagem da MEC.

Em resumo podemos sugerir que a diminuição na expressão dos colágenos I, III e na atividade da MMP2 é responsável pelo aumento na deposição destes colágenos no grupo 30-50D. Enquanto o aumento na deposição dos colágenos III e V no grupo 90-110D desencadeou o aumentou da atividade de MMP2, induzindo a um novo ciclo remodelação.

Estes resultados, entretanto, não são completamente compatíveis com estudos feitos em outras espécies. Por exemplo, análise imunohistoquímica dos colágenos tipo I e III na placenta de ratas portadoras de diabetes do tipo 1 não apresentaram alterações na deposição destas moléculas (83). Além disso, observou-se aumento da atividade de ambos MMP2 e MMP9 em placentas de ratas portadoras de diabetes tipo 1 (119). Nesses estudos, entretanto os animais foram tratados com insulina durante o período experimental. Em conjunto, nossos resultados corroboram com os encontrados na literatura, e indicam que o desenvolvimento de complicações na placenta depende não apenas do modelo de diabetes utilizado, mas, também de outros fatores como: espécie do animal, linhagem, entre outros (89,90,120,121). Resultados anteriores de nosso grupo mostraram diferenças importantes entre a composição e organização da MEC entre camundongos e ratos, entre essas, a presença de fibrilas de colágeno, muito espessas em camundongos (29), que não encontra contrapartida na decídua de ratas. Além destes fatos, há que se considerar a diversidade de abordagens metodológicas e a aferição dos valores de referência nos diferentes estudos, o que pode levar a resultados diferentes.

Todos os colágenos fibrilares (tipos I, III e V) imunolocalizados no labirinto da placenta de camundongos também são encontrados nas vilosidades da placenta humana (122). Do mesmo modo, as alterações observadas na deposição de colágeno no labirinto nesse estudo são similares àquelas descritas em humanos (123). O colágeno fibrilar presente nas vilosidades coriônicas - região análoga à região de labirinto em camundongos - de placentas de mulheres com diabetes tipo 1 e 2, bem como no diabetes gestacional é mais abundante do que em mulheres normoglicêmicas (123). Tal similaridade reforça a validade do modelo de camundongos para a compreensão das lesões placentárias associadas ao diabetes em seres humanos. A contribuição individual de cada um dos tipos de colágeno não foi investigada nos estudos acima citados.

Sob a influência de fatores angiogênicos, células angiogênicas e trofoblásticas migram através da MEC esculpindo a rede vascular da placenta, que é essencial para sua fisiologia (124,125). Além das alterações da MEC, da expressão de fatores antigênicos e de seus receptores, alterações vasculares da placenta foram relatadas em placentas diabéticas (106,123,126,127). O papel fundamental dos fatores angiogênicos, componentes da MEC e

MMPs na angiogênese, permite-nos sugerir que distúrbios simultâneos sobre esses fatores ocasionados pelo diabetes têm potencial para prejudicar a formação do labirinto, bem como suas funções.

Em conclusão, nossos resultados reforçam estudos anteriores do LBR/MEC sobre a importância do fator temporal para o desenvolvimento de complicações do diabetes sobre a gestação (89,90). Além disso adicionam novos conhecimentos sobre o efeito temporal do diabetes, particularmente, no desenvolvimento placentário e fetal. Importantemente, estes resultados mostram que alguns desses animais são capazes de desenvolver estratégias específicas em busca de uma melhor adaptação frente ao diabetes.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados por este estudo permite concluir que:

1) O ciclo estral é afetado pelo diabetes de modo diretamente relacionado com a sua duração. Dentre as modificações encontradas, destacam-se: (i) alterações no perfil temporal das fases do ciclo; (ii) metacromasia decorrente de alteração da flora vaginal.

2) As alterações promovidas no perfil reprodutivo foram dependentes da duração do diabetes, a saber:

    a. O diabetes de curto prazo (30-50D) promoveu altas taxas de perdas embrionárias iniciais e restrição de crescimento na maioria dos fetos.

    b. O diabetes de longa duração (90-110D) promoveu malformações, mortes fetais e restrição de crescimento intrauterino em parte dos fetos. O aumento no peso de algumas placentas neste grupo foi associada a fetos com pesos semelhante ao controle, indicando que o aumento do peso placentário contribui para garantir o desenvolvimento fetal.

3) As placentas diabéticas apresentaram a região de labirinto diminuída em relação à área total da placenta, além da redução da rede vascular.

4) Alterações na expressão do RNAm e na deposição de componentes da matriz extracelular, bem como na atividade das MMPs, foram dependentes da progressão do diabetes.

    a. No grupo 30-50D o diabetes promoveu aumento da expressão e deposição do colágeno tipo I e em aumento da expressão de colágeno tipo III em 43% dos animais e aumento da deposição de colágeno tipo IV na membrana basal da rede vascular. Neste grupo houve diminuição dos níveis de expressão do colágeno V e da atividade da MMP9.

    b. No grupo 90-110D, o diabetes não promoveu alteração na expressão do RNAm de nenhum dos colágeno analisados. Porém a deposição dos colágenos III, IV e V foi aumentada, tambémhouve aumento da atividade da MMP2 neste grupo.

[1]REFERÊNCIAS

1. Shorr E. A NEW TECHNIC FOR STAINING VAGINAL SMEARS: III, A SINGLE DIFFERENTIAL STAIN. Science [Internet]. 1941 Dec 5 [cited 2014 Jan 11];94(2449):545–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17756667

2. Rugh R. The mouse - Reproduction and development. Minneapolis: Burgess Publishing Company; 1968.

3. Salgado RM. Caracterização de proteoglicanos do útero de camundongos durante o ciclo estral e em animais ovarectomizados: análise dos efeitos da castração e da reposição hormonal. Universidade de São Paulo; 2009.

4. Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. Hum Reprod [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Jan 11];21(2):327–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239312

5. Guyton, A. C. e Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 12th ed. Elsevier; 2011.

6. Moore KL. Embriologia Clinica. 8th ed. Elsevier; 2008.

7. Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. J Exp Zool. 1993;266:603–28.

8. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. Placenta. 2002;23:3–19.

9. Abrahamsohn PA. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. Anat Embryol (Berl). 1983;166:263–74.

10. RH K. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. Physiol Zool. 1937;10:212–38.

[1] De acordo com: International Committe of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal. [2011 Jul 15]. Available from: http//nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

11. CA F. The Implantation reaction. In: RM W, editor. Biology od the Uterus. 2nd ed. New York: Plennum Press; 1977. p. 245–308.

12. Welsh AO, Enders AC. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. Am J Anat [Internet]. 1985 Jan [cited 2013 Nov 23];172(1):1–29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3969928

13. PA A. Morphology of the decidua. In: K Y, editor. Blastocyst Implantatiom. Boston: Adams Publishing Group; 1989. p. 127–33.

14. S. APZTO. Decídua in rodents. In: SR Glasser, JD Aplin LG and ST, editor. The endometrium. London; 2002. p. 279–93.

15. Winterhager E, Stutenkemper R, Traub O, Beyer E, Willecke K. Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. Eur J Cell Biol [Internet]. 1991 Jun [cited 2013 Nov 23];55(1):133–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655436

16. Glasser SR, Julian J. Intermediate filaments of the midgestation rat trophoblast giant cell. Dev Biol [Internet]. 1986 Feb [cited 2013 Nov 23];113(2):356–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419186

17. Ilgren EB. Placental polyploidization: a comparative study in the mouse and the guinea pig. Placenta [Internet]. [cited 2013 Nov 23];2(4):333–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7301780

18. Gu Y, Gibori G. Isolation, culture, and characterization of the two cell subpopulations forming the rat decidua: differential gene expression for activin, follistatin, and decidual prolactin-related protein. Endocrinology [Internet]. 1995 Jun [cited 2013 Nov 23];136(6):2451–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538462

19. Katz S, Abrahamsohn PA. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study. Anat Embryol (Berl). 1987;176:251–8.

20. De Feo VJ. Decidualization. In: M. WR, editor. Cellular Biology of the uterus. Amsterdam: North Holland; 1967. p. 192–291.

21. Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. Arch Biol Med Exp (Santiago) [Internet]. 1989 Jul [cited 2014 Feb 17];22(2):107–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2619314

22. Finn CA. The biology of decidual cells. Adv Reprod Physiol [Internet]. 1971 Jan [cited 2014 Feb 17];5:1–26. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4949999

23. Jayatilak PG, Puryear TK, Herz Z, Fazleabas A, Gibori G. Protein secretion by mesometrial and antimesometrial rat decidual tissue: evidence for differential gene expression. Endocrinology [Internet]. 1989 Aug [cited 2014 Feb 17];125(2):659–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2752972

24. Gu Y, Jayatilak PG, Parmer TG, Gauldie J, Fey GH, Gibori G. Alpha 2-macroglobulin expression in the mesometrial decidua and its regulation by decidual luteotropin and prolactin. Endocrinology [Internet]. 1992 Sep [cited 2014 Feb 17];131(3):1321–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380439

25. Rasmussen CA, Hashizume K, Orwig KE, Xu L, Soares MJ. Decidual prolactin-related protein: heterologous expression and characterization. Endocrinology [Internet]. 1996 Dec [cited 2014 Feb 17];137(12):5558–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940384

26. Candeloro L, Zorn TMT. Distribution and spatiotemporal relationship of activin a and follistatin in mouse decidual and placental tissue. Am J Reprod Immunol [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Nov 21];58(5):415–24. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922694

27. Candeloro L, Zorn TMT. Granulated and non-granulated decidual prolactin-related protein-positive decidual cells in the pregnant mouse endometrium. Am J Reprod Immunol [Internet]. 2007 Feb [cited 2013 Nov 21];57(2):122–32. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217366

28. Robertson SA, Mau VJ, Hudson SN, Tremellen KP. Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. Am J Reprod Immunol [Internet]. 1997 Jun [cited 2014 Feb 17];37(6):438–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228299

29. Alberto-Rincon MC, Zorn TM, Abrahamsohn PA. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. Am J Anat. 1989;186:417–29.

30. Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, et al. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. Development [Internet]. 1996 Jun [cited 2014 Feb 17];122(6):1723–36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674412

31. Carbone K, Pinto NMP, Abrahamsohn PA, Zorn TMT. Arrangement and fine structure of collagen fibrils in the decidualized mouse endometrium. Microsc Res Tech. 2006;69:36–45.

32. Spiess K, Teodoro WR, Zorn TMT. Distribution of collagen types I, III, and V in pregnant mouse endometrium. Connect Tissue Res [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Nov 22];48(2):99–108. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453912

33. Martello EM, Abrahamsohn PA. Collagen distribution in the mouse endometrium during decidualization. Acta Anat (Basel). 1986;127:146–50.

34. Zorn TM, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. Cell Tissue Res. 1986;244:443–8.

35. Zorn TM, Bijovsky AT, Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Phagocytosis of collagen by mouse decidual cells. Anat Rec. 1989;225:96–100.

36. Carson DD, Dutt A, Tang JP. Glycoconjugate synthesis during early pregnancy: hyaluronate synthesis and function. Dev Biol [Internet]. 1987 Mar [cited 2013 Nov 23];120(1):228–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3817291

37. Greca CP, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Ultrastructural cytochemical study of proteoglycans in the endometrium of pregnant mice using cationic dyes. Tissue Cell. 1998;30:304–11.

38. Greca CD, Nader HB, Dietrich CP, Abrahamsohn PA, Zorn TM. Ultrastructural cytochemical characterization of collagen-associated proteoglycans in the endometrium of mice. Anat Rec. 2000;259:413–23.

39. San Martin S, Soto-Suazo M, De Oliveira SF, Aplin JD, Abrahamsohn P, Zorn TMT. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. Reproduction [Internet]. 2003 Apr;125(4):585–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12683929

40. Malassine a., Frendo J-L, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2013 Nov 21];9(6):531–9. Available from: http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/dmg043

41. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. Nat Rev Genet. 2001;2:538–48.

42. Peel S, Stewart I. Rat granulated metrial gland cells differentiate in pregnant chimeric mice and may be cytotoxic for mouse trophoblast. Cell Differ Dev [Internet]. 1989 Oct [cited 2013 Nov 23];28(1):55–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2804734

43. Hofmann AP, Gerber SA, Croy BA. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. Mol Hum Reprod [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Feb 17];20(1):66–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24000237

44. Acar N, Ustunel I, Demir R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. Acta Histochem [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Feb 17];113(2):82–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047753

45. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science [Internet]. 1994 Dec 2 [cited 2013 Nov 23];266(5190):1508–18. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7985020

46. Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. J Morphol [Internet]. 1988 Dec [cited 2013 Nov 23];198(3):341–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3221406

47. Sutherland A. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. Dev Biol [Internet]. 2003 Jun 15 [cited 2013 Nov 23];258(2):241–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798285

48. Teesalu T, Blasi F, Talarico D. Expression and function of the urokinase type plasminogen activator during mouse hemochorial placental development. Dev Dyn [Internet]. 1998 Sep [cited 2013 Nov 23];213(1):27–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733098

49. Mondino A, Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. Trends Immunol [Internet]. 2004 Aug [cited 2013 Nov 23];25(8):450–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275645

50. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. Dev Dyn [Internet]. 2006 Dec [cited 2013 Nov 23];235(12):3280–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17039549

51. Soares MJ, Müller H, Orwig KE, Peters TJ, Dai G. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. Biol Reprod [Internet]. 1998 Feb [cited 2013 Nov 23];58(2):273–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9475377

52. Redline RW, Patterson P. Patterns of placental injury. Correlations with gestational age, placental weight, and clinical diagnoses. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 1994 Jul [cited 2013 Nov 23];118(7):698–701. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8024402

53. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jan 9];37 Suppl 1(January):S81–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357215

54. Kim NN. Sex steroid hormones in diabetes-induced sexual dysfunction: focus on the female gender. J Sex Med [Internet]. 2009 Mar [cited 2014 Jan 11];6 Suppl 3:239–46. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19267847

55. Yeshaya A, Orvieto R, Dicker D, Karp M, Ben-Rafael Z. Menstrual characteristics of women suffering from insulin-dependent diabetes mellitus. Int J Fertil Menopausal Stud [Internet]. [cited 2014 Jan 11];40(5):269–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8556032

56. Dorman JS, Steenkiste AR, Foley TP, Strotmeyer ES, Burke JP, Kuller LH, et al. Menopause in type 1 diabetic women: is it premature? Diabetes [Internet]. 2001 Aug [cited 2014 Jan 11];50(8):1857–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473049

57. Durando B, Deriso L, Krug E, Toczek T, Koerbel G, Tedesco MB FJ, M and K. Prevalence of menstrual abnormalities and androgen excess in women with type 1 and type 2 diabetes mellitus. Diabetes. 2003;52(Suppl A):497–501.

58. Strotmeyer ES, Steenkiste AR, Foley TP, Berga SL, Dorman JS. Menstrual cycle differences between women with type 1 diabetes and women without diabetes. Diabetes Care [Internet]. 2003 Apr [cited 2014 Jan 11];26(4):1016–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663566

59. Salonia A, Lanzi R, Scavini M, Pontillo M, Gatti E, Petrella G, et al. Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. Diabetes Care [Internet]. 2006 Feb;29(2):312–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16443879

60. Stamataki KE, Spina J, Rangou DB, Chlouverakis CS, Piaditis GP. Ovarian function in women with non-insulin dependent diabetes mellitus. Clin Endocrinol (Oxf) [Internet]. 1996 Nov [cited 2014 Feb 18];45(5):615–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8977760

61. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. JAMA [Internet]. 2006

Mar 15 [cited 2014 Jan 21];295(11):1288–99. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16537739

62. Tesone M, Ladenheim RG, Oliveira-Filho RM, Chiauzzi VA, Foglia VG, Charreau EH. Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. Proc Soc Exp Biol Med [Internet]. 1983 Oct 15 [cited 2014 Jan 11];174(1):123–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/314340

63. Kirchick HJ, Keyes PL, Frye BE. An explanation for anovulation in immature alloxan-diabetic rats treated with pregnant mare's serum gonadotropin: reduced pituitary response to gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology [Internet]. 1979 Dec [cited 2014 Jan 11];105(6):1343–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/387383

64. Katayama S, Brownscheidle CM, Wootten V, Lee JB, Shimaoka K. Absent or delayed preovulatory luteinizing hormone surge in experimental diabetes mellitus. Diabetes [Internet]. 1984 Apr [cited 2014 Jan 11];33(4):324–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6368291

65. Johnson LM, Sidman RL. A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. Biol Reprod [Internet]. 1979 Apr [cited 2014 Jan 11];20(3):552–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/378276

66. Rosmalen JG, Pigmans MJ, Kersseboom R, Drexhage HA, Leenen PJ, Homo-Delarche F. Sex steroids influence pancreatic islet hypertrophy and subsequent autoimmune infiltration in nonobese diabetic (NOD) and NODscid mice. Lab Invest [Internet]. 2001 Feb [cited 2014 Jan 11];81(2):231–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11232645

67. Thliveris JA, Paz GF, Rempel E, Faiman C. An extra-pancreatic direct effect of streptozotocin on the hypothalamo-hypophyseal-testicular axis in the rat. Anat Anz [Internet]. 1984 Jan [cited 2014 Jan 11];157(3):213–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6239564

68. Pérez Díaz J, Benitez A, Fernández Galaz C. Effect of streptozotocin diabetes on the pituitary-testicular axis in the rat. Horm Metab Res [Internet]. 1982 Sep [cited 2014 Jan 11];14(9):479–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6815042

69. Cunningham FG, Macdonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GD, Clark SL W. Obstetric. 4th ed. Stamford CT, USA: Appleton & Lange; 1997.

70. Makhseed M, Musini VM, Ahmed MA, Al-Harmi J. Placental pathology in relation to the White's classification of diabetes mellitus. Arch Gynecol Obstet [Internet]. 2002 Jul [cited 2013 Nov 23];266(3):136–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197551

71. Desoye G KP. The Human Pacenta in Diabetes. In: Djelmis J, Desoye G I, editor. Diabetology of Pregnancy (Frontier in Diabetes). vol 17. Basel (Switzerland): Karger; 2005. p. 94–109.

72. Jawerbaum A, González E. Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment. Curr Med Chem [Internet]. 2006 Jan [cited 2014 Jan 20];13(18):2127–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918343

73. Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, Cetin I. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. Placenta [Internet]. 2003 Apr [cited 2013 Nov 23];24(4):343–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657507

74. Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP. High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. Am J Physiol [Internet]. 1990 Oct [cited 2013 Nov 23];259(4 Pt 2):F704–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2221106

75. Ayo SH, Radnik RA, Glass WF, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, et al. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. Am J Physiol [Internet]. 1991 Feb [cited 2013 Nov 23];260(2 Pt 2):F185–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1996670

76. Cagliero E, Maiello M, Boeri D, Roy S, Lorenzi M. Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. J Clin Invest [Internet]. 1988 Aug [cited 2013 Nov 23];82(2):735–8. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

77. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H. ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. Diabetes [Internet]. 1992 Dec [cited 2013 Nov 23];41(12):1520–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280237

78. Hasslacher C, Kopischke HG, Bürklin E, Gechter F, Reichenbacher R. In vivo studies on basement membrane synthesis in diabetic and nondiabetic rats. Res Exp Med (Berl) [Internet]. 1982 Jan [cited 2013 Nov 23];181(3):245–51. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7163652

79. Rohrbach DH, Wagner CW, Star VL, Martin GR, Brown KS, Yoon JW. Reduced synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in streptozotocin-induced diabetic mice. J Biol Chem [Internet]. 1983 Oct 10 [cited 2013 Nov 23];258(19):11672–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225778

80. Shimomura H, Spiro RG. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. Diabetes [Internet]. 1987 Mar [cited 2013 Nov 23];36(3):374–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2948855

81. Poulsom R, Kurkinen M, Prockop DJ, Boot-Handford RP. Increased steady-state levels of laminin B1 mRNA in kidneys of long-term streptozotocin-diabetic rats. No effect of an aldose reductase inhibitor. J Biol Chem [Internet]. 1988 Jul 25 [cited 2013 Nov 23];263(21):10072–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2839472

82. Laurin J, Lingman G, Marsál K, Persson PH. Fetal blood flow in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. Obstet Gynecol [Internet]. 1987 Jun [cited 2013 Nov 23];69(6):895–902. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3554065

83. Giachini FRC, Carriel V, Capelo LP, Tostes RC, Carvalho MH, Fortes ZB, et al. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. J Anat [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Nov 7];212(1):31–41. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2423385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

84. Forsberg H, Wentzel P, Eriksson UJ. Maternal diabetes alters extracellular matrix protein levels in rat placentas. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 1998 Sep;179(3 Pt 1):772–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9757988

85. Yang W-C V, Su T-H, Yang Y-C, Chang S-C, Chen C-Y, Chen C-P. Altered perlecan expression in placental development and gestational diabetes mellitus. Placenta [Internet]. 2005 Nov [cited 2013 Nov 21];26(10):780–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226129

86. Barnes S, Berkowitz G, Hirschowitz BI, Wirtschafter D, Cassady G. Postnatal physiologic hypercholemia in both premature and full-term infants. J Clin Invest [Internet]. 1981 Sep [cited 2013 Nov 23];68(3):775–82. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

87. Kalter H. Reproductive Toxicology Review. 1996;10(6).

88. Yu Y, Singh U, Shi W, Konno T, Soares MJ, Geyer R, et al. Influence of murine maternal diabetes on placental morphology, gene expression, and function. Arch Physiol Biochem [Internet]. 2008 Apr [cited 2013 Nov 21];114(2):99–110. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18484278

89. Favaro RR, Salgado RM, Raspantini PR, Fortes ZB, Zorn TMT. Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. Int J Exp Pathol [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Nov 21];91(5):426–35. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3003840&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

90. Favaro RR, Salgado RM, Covarrubias a C, Bruni F, Lima C, Fortes ZB, et al. Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. Placenta [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Sep 30 [cited 2013 Nov 22];34(12):1128–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125804

91. Zorn TMT, Zúñiga M, Madrid E, Tostes R, Fortes Z, Giachini F, et al. Maternal diabetes affects cell proliferation in developing rat placenta. Histol Histopathol. 2011;26:1049–56.

92. McManus JFA MR. Staining Methods, Histologic and Histochemical. Paul B. Hoeber, editor. New York: Medical Div., Harper & Row Publishers; 1960.

93. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA FA. Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. 2nd ed. São Paulo: Manole; 2003.

94. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods [Internet]. 2001 Dec [cited 2013 Nov 6];25(4):402–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609

95. Arrais RF, Dib S a. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. Hum Reprod [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Jan 13];21(2):327–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239312

96. Butler SO, Btaiche IF, Alaniz C. Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients. Pharmacotherapy [Internet]. 2005 Jul;25(7):963–76. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242789

97. Bhasin S, Enzlin P, Coviello A, Basson R. Sexual dysfunction in men and women with endocrine disorders. Lancet [Internet]. 2007 Feb 17 [cited 2014 Feb 18];369(9561):597–611. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307107

98. Kirchick HJ, Keyes PL, Frye BE. Restoration of the LH surge and ovulation by insulin in alloxan-diabetic immature rats treated with pregnant mare’s serum gonadotrophin.

Acta Endocrinol (Copenh) [Internet]. 1982 Jun [cited 2014 Jan 11];100(2):266–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7051719

99. Blades RA, Bryant KR, Whitehead SA. Feedback effects of steroids and gonatrophin control in adult rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Diabetologia [Internet]. 1985 Jun [cited 2014 Mar 11];28(6). Available from: http://link.springer.com/10.1007/BF00283142

100. Coiro V, Volpi R, Bertoni P, Marcato A, Vourna S, Bocchi R, et al. Restoration of normal gonadotropin responses to naloxone by chronic bromocriptine treatment in elderly men. Horm Res [Internet]. 1991 Jan [cited 2014 Jan 11];36(1-2):36–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1814799

101. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. Endocr Rev [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Nov 14];31(5):680–701. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20534704

102. Cox P, Marton T. Pathological assessment of intrauterine growth restriction. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Dec [cited 2013 Nov 12];23(6):751–64. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854107

103. De Hertogh R. Maternal Diabetes and Embryonic Development. In: J. Deslmis; G. Desoye; M. Ivanisevic, editor. Diabetology of Pregnancy (Frontier in Diabetes). Karger; 2005. p. 17: 58–71.

104. Torchinsky A, Toder V, Carp H, Orenstein H, Fein A. In vivo evidence for the existence of a threshold for hyperglycemia-induced major fetal malformations: relevance to the etiology of diabetic teratogenesis. Early Pregnancy. 1997;3:27–33.

105. Wender-Ozegowska E, Wróblewska K, Zawiejska A, Pietryga M, Szczapa J, Biczysko R. Threshold values of maternal blood glucose in early diabetic pregnancy--prediction of fetal malformations. Acta Obstet Gynecol Scand [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Nov 24];84(1):17–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15603562

106. Salim MD, Al-Matubsi HY, El-Sharaky AS, Kamel M a-N, Oriquat G a, Helmy MH, et al. The levels of vascular endothelial growth factor-A and placental growth factor-2 in

embryopathy associated with experimental diabetic gestation. Growth Factors [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Nov 21];27(1):32–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19048427

107. Karlsson K, Kjellmer I. The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 1972 Jan 15 [cited 2013 Nov 22];112(2):213–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5008447

108. Chung CS, Myrianthopoulos NC. Factors affecting risks of congenital malformations. II. Effect of maternal diabetes on congenital malformations. Birth Defects Orig Artic Ser [Internet]. 1975 Jan [cited 2013 Nov 22];11(10):23–38. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/769859

109. Burke SD, Dong H, Hazan AD, Croy BA. Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. Diabetes. 2007;56:2919–26.

110. Suwaki N, Masuyama H, Masumoto A, Takamoto N, Hiramatsu Y. Expression and Potential Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g in the Placenta of Diabetic Pregnancy. 2007;28.

111. Stanley JL, Ashton N, Taggart MJ, Davidge ST, Baker PN. Uterine artery function in a mouse model of pregnancy complicated by diabetes. Vascul Pharmacol [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 [cited 2013 Nov 21];50(1-2):8–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778794

112. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. Biol Reprod [Internet]. 2004 Jun [cited 2014 Jan 13];70(6):1806–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973263

113. Zabihi S, Wentzel P, Eriksson UJ. Altered uterine perfusion is involved in fetal outcome of diabetic rats. Placenta [Internet]. 2008 May [cited 2013 Nov 22];29(5):413–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18387670

114. Boileau P, Mrejen C, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Overexpression of GLUT3 placental glucose transporter in diabetic rats. J Clin Invest [Internet]. 1995

Jul;96(1):309–17. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=185202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

115. Ogura K, Sakata M, Yamaguchi M, Kurachi H, Murata Y. High concentration of glucose decreases glucose transporter-1 expression in mouse placenta in vitro and in vivo. J Endocrinol [Internet]. 1999 Mar [cited 2013 Nov 24];160(3):443–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10076190

116. Jansson T, Ylvén K, Wennergren M, Powell TL. Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. Placenta [Internet]. 2002 May [cited 2013 Nov 24];23(5):392–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061855

117. Arai KY, Nishiyama T. Developmental changes in extracellular matrix messenger RNAs in the mouse placenta during the second half of pregnancy: possible factors involved in the regulation of placental extracellular matrix expression. Biol Reprod [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Nov 22];77(6):923–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881772

118. Chang S-C, Vivian Yang W-C. Hyperglycemia induces altered expressions of angiogenesis associated molecules in the trophoblast. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2013 Jan;2013(30 mM):457971. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3745874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

119. Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, White V, Capobianco E, González E. Metalloproteinase 2 activity and modulation in uterus from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats during embryo implantation. Reprod Fertil Dev. 2002;14:479–85.

120. Eriksson UJ, Naeser P, Brolin SE. Increased accumulation of sorbitol in offspring of manifest diabetic rats. Diabetes [Internet]. 1986 Dec [cited 2013 Nov 24];35(12):1356–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3770312

121. Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Genetic and environmental influence on diabetic rat embryopathy. Am J Physiol Endocrinol Metab [Internet]. 2011 Mar [cited 2013

Nov 24];300(3):E454–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119026

122. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. Placenta [Internet]. 2008 Sep [cited 2013 Nov 22];29(9):809–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675456

123. Pietro L, Daher S, Rudge MVC, Calderon IMP, Damasceno DC, Sinzato YK, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. Placenta [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Sep [cited 2013 Nov 22];31(9):770–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674013

124. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. Hum Reprod Update [Internet]. 1996 [cited 2013 Nov 24];2(4):307–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9080228

125. Harris LK, Crocker IP, Baker PN, Aplin JD, Westwood M. IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor. Biol Reprod [Internet]. 2011 Mar [cited 2013 Nov 24];84(3):440–6. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3043127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

126. Dubova EA, Pavlov KA, Esayan RM, Degtyareva EI, Shestakova M V, Shchegolev AI, et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in the placenta of women with type 1 diabetes mellitus. Bull Exp Biol Med [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Nov 24];152(3):367–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22803088

127. Szukiewicz D, Kochanowski J, Pyzlak M, Szewczyk G, Stangret A, Mittal TK. Fractalkine (CX3CL1) and its receptor CX3CR1 may contribute to increased angiogenesis in diabetic placenta. Mediators Inflamm [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Nov 24];2013:437576. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3730155&tool=pmcentrez&rendertype=abstract