



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

ANNE CAROLLINE VERÍSSIMO DOS SANTOS

ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS DECORRENTES DO
DIABETES TIPO 1 EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS NÃO OBESOS (NOD)

ARACAJU

2016

ANNE CAROLLINE VERÍSSIMO DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS DECORRENTES DO
DIABETES TIPO 1 EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS NÃO OBESOS (NOD)**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Marlúcia Bastos Aires

ARACAJU

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237a Santos, Anne Caroline Veríssimo dos
Alterações placentárias decorrentes do diabetes tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD) / Anne Caroline Veríssimo dos Santos ; orientador Márcio Roberto Viana Santos ; co-orientadora Marlúcia Bastos Aires. – Aracaju, 2016.
61 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Placenta. 3. Camundongos. I. Santos, Márcio Roberto Viana, orient. II. Aires, Marlúcia Bastos, co-orient. III. Título.

CDU 616.379-008.64

ANNE CAROLLINE VERÍSSIMO DOS SANTOS

ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS DECORRENTES DO
DIABETES TIPO 1 EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS NÃO OBESOS (NOD)

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos
Universidade Federal de Sergipe - Orientador

1º Examinador: Profa. Dra. Marlúcia Bastos Aires
Universidade Federal de Sergipe - DMO/UFS

2º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Anselmo Cazzaniga
Universidade Federal de Sergipe – UFS

PARECER

***“Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante é
dar o primeiro passo.”
(Vinícius de Moraes)***

Agradecimentos

À Deus, meu maior ajudador e companheiro de todas as horas, tenho certeza que só cheguei aqui graças o seu amor. Minha eterna gratidão;

Aos meus pais, minha maior fonte de inspiração pra seguir em frente. Obrigada por toda ajuda que sempre me deram e por acreditar em mim. Eu amo vocês e esse amor sempre vai fazer com que eu vença todas as jornadas da vida. Mãe que Deus conforte seu coração de mãe em todas as noites de preocupação que passou e passa pensando na filha tão longe;

À minha segunda mãe “tia Celeste”, por incentivar e torcer por mim todos esses anos e por fazer muito mais do que deveria me ajudando em momentos difíceis e contribuindo para a realização de mais um sonho. Agradeço também ao seu esposo José Manoel;

Aos meus irmãos Lucas e Davi, por acrescentarem amor em nosso lar e por torcerem por mim em cada uma das minhas decisões por novos caminhos. O agradecimento também vai pra Fernanda, minha cunhada por quem tenho sentimento de irmã. Obrigada meus amores;

Aos demais familiares (tios, primos, avôs) sei que vocês também estiveram torcendo por mim, desejo que Deus abençoe a vida de cada um de vocês;

Ao meu namorado Cícero, um dos presentes mais lindos de Deus. Obrigada por compreender essa etapa e por ficar do meu lado. Estendo os meus agradecimentos a sua família em especial à Dona Maria;

Às minhas amigas de Lab, Letícia, Priscilla, Karine, Janete, Gaby e Taynar pela contribuição nesses anos, obrigada meninas pela força;

À Milene Tavares Fontes, pela ajuda, companheirismo e confiança;

Às minhas companheiras e amigas de apartamento em São Paulo, Sabrina e Lucy. Obrigada meninas pelo carinho;

Ao prof. Dr. Durvanei pela acolhida eu não tenho palavras pra agradecer e nem “milhões”, mas, saiba que foi de extrema importância. Estendo os agradecimentos a sua turma do “Lab Bioquímica” pela recepção e por me fazerem sentir parte da família. Obrigada a todos de coração;

À Arthur Cássio de Lima Luna meu conterrâneo. Obrigada por todo apoio científico e filosófico;

À profa. Dra. Estela Bevilacqua pela colaboração e confiança obrigada por compartilhar dos recursos e do conhecimento. Agradeço a todos do seu Lab, mas, em especial quero agradecer à sua aluna Aline Paixão pela dedicação ao nosso trabalho e por ser sempre tão solícita. Deus abençoe todos vocês;

Aos amigos dos laboratórios por onde andei, agradeço a todos os técnicos, funcionários e professores. Muito Obrigada;

Ao meu orientador prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos, obrigada por todas as oportunidades dadas nessa caminhada científica. Sem dúvida cada sim seu sempre significou muito. Muito obrigada;

À minha co-orientadora profa. Dra. Marlúcia Bastos Aires e à sua família (Giuliano e Matheus). Obrigada professora pelos ensinamentos, paciência e confiança. Passamos por muitos atropelos pra chegar ao final, mas, que bom que chegamos aqui. Sem sua ajuda seria impossível chegar à conclusão desse trabalho;

Aos colegas e professores do núcleo, coordenadora profa Dra. Amélia de Jesus, secretárias e demais funcionários. Agradeço porque sempre estiveram prontos a ajudar;

À CAPES órgão financiador desse trabalho.

RESUMO

SANTOS A. C. V. **ALTERAÇÕES PLACENTÁRIAS DECORRENTES DO DIABETES TIPO 1 EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS (NOD)** 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

O camundongo diabético não obeso (NOD) é um modelo experimental amplamente utilizado em trabalhos por desenvolver um quadro fenotípico de diabetes mellitus do tipo 1, similar à doença humana. Na gestação a placenta é um órgão vital, sendo capaz de desenvolver diversas funções que possibilitam um desenvolvimento fetal saudável. Modificações na sua estrutura e função comprometem a sobrevivência e o crescimento do feto. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência da hiperglicemia nas alterações placentárias em camundongos NOD. Foram utilizadas fêmeas NOD hiperglicêmicas (NODH) (glicemia sem jejum $\geq 270,0$ mg/dl, $n = 6$), NOD normoglicêmicas (NODN) (glicemia sem jejum $< 180,0$ mg/dl, $n = 6$) e fêmeas Balb-c ($n = 8$). As placentas foram coletadas no dia 19,5 de gestação (dg). Os seguintes dados foram analisados: peso materno, fetal e placentário; alterações morfológicas placentárias; expressão imunohistoquímica de CD105, Caspase-3 e Histona-3; e ensaio imunoenzimático de CD105, PGIF-2 e VEGF-A. O peso materno das fêmeas NODH foi significativamente menor no 0,5 dg comparado aos grupos NODN e Balb-c. Verificou-se uma diminuição no peso dos fetos no grupo NODH quando comparado ao grupo Balb-c (989 ± 68 vs 1290 ± 57 mg, $p < 0,05$, $n = 8$). O peso placentário foi maior no grupo NODH com relação ao NODN e Balb-c (190 ± 26 vs 130 ± 4 mg, $p < 0,0001$; 155 ± 8 mg, $p < 0,05$, $n = 8$). Observou-se nos camundongos NODH aumento da zona juncional (ZJ) e redução no labirinto (L), as células dessas regiões apresentavam alterações nucleares e citoplasmáticas quando comparadas aos grupos NODN e Balb-c. Observou-se no L redução de CD105 no grupo NODH ($206,9 \pm 62,7\%$, $p < 0,0001$) comparado aos grupos Balb-c ($847,9 \pm 65,4\%$, $p < 0,0001$) e NODN ($500,2 \pm 2,6\%$, $p < 0,001$), na ZJ não houve diferença. Na ZJ das placentas do grupo NODH redução de Caspase-3 ($663 \pm 107,2 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) comparado aos grupos Balb-c ($1848 \pm 74,3 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) e NODN ($1239 \pm 55,4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$). Houve aumento de Histona-3 na ZJ no grupo NODH ($259,7 \pm 20,4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$), sendo similar aos grupos NODN ($154,8 \pm 16,6 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$) e Balb-c ($154,8 \pm 30 \mu\text{m}^2$, $p < 0,05$), enquanto no L foi menor no grupo NODH ($261,5 \pm 14,5 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$) em relação ao Balb-c ($653,0 \pm 96 \mu\text{m}^2$, $p < 0,001$). A concentração de CD105 foi maior no grupo NODH no soro ($5,28 \pm 0,36$ x $3,02 \pm 0,47$ pg/ml, NODN $p < 0,05$) e na placenta ($69,72 \pm 0,48$ x $56,48 \pm 4,5$ pg/ml, NODN $p < 0,05$ x Balb-c $50,29 \pm 2,4$ pg/ml, $p < 0,001$). A concentração de PIGF-2 foi maior na placenta do grupo NODH ($2,92 \pm 0,07$ pg/ml, $p < 0,001$) comparado aos grupos Balb-c ($1,86 \pm 0,11$ pg/ml, $p < 0,001$) e NODN ($2,45 \pm 0,16$ pg/ml, $p < 0,05$) e não houve diferença no soro. As concentrações de VEGF-A no soro e na placenta foram semelhantes entre os grupos. A hiperglicemia nesse modelo animal foi capaz de modificar as regiões da placenta e suas estruturas celulares o que pode ter alterado os eventos de apoptose, proliferação celular e angiogênese.

Palavras-chave: Camundongos (NOD). Diabetes tipo 1. Placenta. Alterações vasculares.

ABSTRACT

SANTOS A. C. V. **CHANGES IN PLACENTAL ARISING OUT OF DIABETES TYPE 1 IN NON-OBESE DIABETIC MICE (NOD)**. 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

The non-obese diabetic (NOD) mouse is an experimental model largely used in research due to its development of a phenotypic condition of type 1 Diabetes Mellitus, sharing similarities with the disease in humans. During pregnancy the placenta is a vital organ which develops a diversity of functions that enables the development of a healthy fetus. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of hyperglycemia on placental changes of NOD mice. It was used hyperglycemic NOD female (HNOD) (non- fasting blood glucose test ≥ 270.0 mg/dl, n = 6), normoglycemic NOD female (NNOD) (non- fasting blood glucose test < 180 mg/dl, n = 6) and Balb-c female (n = 8) in this experiment. Placentas were collected at 19.5 gestation day (gd). Data analyzed included maternal, fetal and placental weight; placental morphological changes; immunohistochemical expression of CD105, Caspase-3 and Histone-3; and enzyme-linked immunosorbent assay CD105, PIGF-2 and VEGF-A. HNOD females weight was significantly lower at 0.5 gd when compared to NNOD and Balb-c. It was observed a decrease in fetal weight in HNOD when compared to Balb-c (989 ± 68 vs 1290 ± 57 mg, $p < 0.05$; n = 8). Placental weight was higher in HNOD in relation to NNOD and Balb-c (190 ± 26 vs 130 ± 4 p < 0.0001; 155 ± 8 mg, $p < 0.001$; n = 8). It was observed an increase of junctional zone (JZ) as well as a decrease of labyrinth (L) of HNOD group, in which it was also noticed nuclear and cytoplasmic alterations on cell populations of both areas when compared to NNOD and Balb-c. It was seen Caspase-3 decrease in JZ and an increase of Histone-3 in JZ of HNOD placentas. Regarding the labyrinth, where fetal-maternal exchange occurs, this group showed CD105 decrease and Histone-3 increase when compared with other groups. In the LZ the CD105 reactivity showed decreased in HNOD ($206.9 \pm 62.7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$) compared to Balb-c ($847.9 \pm 65.4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$) and NNOD ($500.2 \pm 2.6 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) whereas in the JZ there was no difference between groups. For Caspase-3, reduced reactivity in the JZ was observed in HNOD ($663 \pm 107.2 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) compared to Balb-c ($1848 \pm 74.3 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) and NNOD ($1239 \pm 55.4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$). In the LZ no difference was verified. For Histone-3, the intensity of reactivity was greater in JZ for HNOD ($259.7 \pm 20.4 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) and similar between Balb-c ($154.8 \pm 30 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$) and NNOD ($154.8 \pm 16.6 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$). Reduced Histone-3 staining was present in LZ of HNOD ($261.5 \pm 14.5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$) compared to Balb-c ($653.0 \pm 96 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$). The concentration of CD105 were higher in HNOD group in serum (5.28 ± 0.36 x 3.02 ± 0.47 pg/ml, NNOD $p < 0.05$) and placenta (69.72 ± 0.48 x 56.48 ± 4.5 NNOD $p < 0.05$ and x Balb-c 50.29 ± 2.4 pg/ml, $p < 0.001$). The placental PIGF2 concentration increased in HNOD (2.92 ± 0.07 pg/ml, $p < 0.001$) compared to Balb-c (1.86 ± 0.11 pg/ml, $p < 0.001$) and NNOD (2.45 ± 0.16 pg/ml, $p < 0.05$) whereas in the serum there was no difference. The serum and placental VEGFA concentrations were similar in all groups. Hyperglycemia was able to modify both placental regions and cellular structures on this experimental model, which might have altered some cellular events like apoptosis, cellular proliferation and angiogenesis.

Keywords: Mice (NOD). Type 1 Diabetes. Placenta. Vascular alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Células do trofoectoderma e suas linhagens diferenciadas.....	21
Figura 2: Regiões da placenta de camundongos: decídua, zona juncional delimitada por suas células trofoblásticas gigantes e região do labirinto com os septos trofoblásticos formado pelas três camadas trofoblásticas.....	22
Figura 3: Esquema das vias de sinalização de CD105 com o TGF- β , modulando a proliferação das células endoteliais.....	27
Figura 4: Presença do “plug” vaginal em fêmeas Balb-c: (A) fêmea Balb-c sem a presença do tampão e (B) tampão presente.....	30
Figura 5: Médias glicêmicas avaliadas no 0,5 dia de gestação (dg) e 19,5 dg das fêmeas dos grupos.....	36
Figura 6: Médias do peso fetal e peso placentário no dia 19,5 de gestação.....	36
Figura 7: Fotomicrografias das placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação com delimitações da decídua (D), zona juncional (ZJ) e labirinto (L), porcentagem das regiões ZJ e L e as alterações morfológicas.....	38
Figura 8: Fotomicrografias das placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação dos grupos com ênfase no labirinto.....	39
Figura 9: Fotomicrografias das placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação dos grupos com coloração de PAS.....	40
Figura 10: Imunolocalização e quantificação de CD105 na zona juncional das placentas no dia 19,5 de gestação.....	41

Figura 11: Imunolocalização e quantificação de CD105 no labirinto das placentas no dia 19,5 de gestação.....	42
Figura 12: Imunolocalização e quantificação de Caspase-3 na zona juncional das placentas no dia 19,5 de gestação.....	43
Figura 13: Imunolocalização e quantificação de Caspase-3 no labirinto das placentas no dia 19,5 de gestação.....	43
Figura 14: Imunolocalização e quantificação de Histona-3 na zona juncional das placentas no dia 19,5 de gestação.....	44
Figura 15: Imunolocalização e quantificação de Histona-3 no labirinto das placentas no dia 19,5 de gestação.....	45
Figura 16: Concentração das proteínas CD105, PIGF-2 e VEGF-A no soro no dia 19,5 de gestação.....	46
Figura 17: Concentração das proteínas CD105, PIGF-2 e VEGF-A na placenta no dia 19,5 de gestação.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos, empresas e diluições utilizadas para reações imunohistoquímicas nos cortes parafinados das placentas no 19,5 de gestação.....32

Tabela 2: Peso corporal das fêmeas (g) avaliado no dia 0,5 e 19,5 de gestação.....35

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALK- Receptor quinase tipo ativina
BMP- Proteína morfogenética óssea
BSA- Albumina de soro bovino
CASPASE 3- Cisteína-aspartato protease-3
CD- *Clauster of differentiation*
CE- Célula espongiotrofoblástica
CG- Célula glicogênica
CT- Citotrofoblasto
CTG- Célula trofoblastica gigante
DAB- Diamino benzindina
Dg- Dia de gestação
DM- Diabetes mellitus
DM1- Diabetes mellitus tipo 1
DM2- Diabetes mellitus tipo 2
DMG- Diabetes gestacional
FGF- Fator de crescimento de fibroblastos
HE- Hematoxilina e Eosina
IFN- γ - Interferon gama
IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IL-2- Interleucina 2
L- Labirinto
NOD- Camundongo diabético não obeso (Non obese diabetic)
PAS- Ácido peróxido de shiff
PCNA- Antígeno nuclear de proliferação celular
PBS- Tampão salina e fosfato
PIGF2- Fator 2 de crescimento vascular placentário
SC- Sinciciotrofoblasto
sEng- Endoglina solúvel
SPG- Células do spongiotrofoblasto
TBS- Tampão salina-tris-fosfato
TGF- β - Fator transformador do crescimento beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VEGFA- Fator A de crescimento endotelial vascular

VF- Vaso fetal

VM- Vaso materno

ZJ- Zona juncional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Diabetes mellitus tipo (DM).....	17
2.2 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e gestação.....	18
2.3 Camundongos diabéticos não obesos (NOD).....	20
2.4 Desenvolvimento da placenta em camundongos.....	21
2.5 Alterações placentárias ocasionadas pelo diabetes.....	23
2.6 Angiogênese placentária.....	24
2.7 Papel da endoglina na angiogênese.....	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais e protocolo experimental.....	29
4.2 Coleta de placentas murinas e eutanásia dos animais.....	30
4.3 Histoprocessamento e análise morfológica.....	31
4.4 Mensuração das regiões.....	31
4.5 Imunohistoquímica.....	31
4.5.1 Análise quantitativa dos marcadores.....	32
4.6 Ensaio imunoenzimático.....	33
4.7 Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Diagnóstico do diabetes e manutenção das fêmeas NOD.....	35
5.2 Avaliação do peso e glicemia materna.....	35
5.3 Avaliação do peso fetal e placentário.....	36
5.4 Avaliação morfológica.....	37
5.5 Avaliação imunohistoquímica.....	41
5.6 Avaliação imunoenzimática.....	45
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma patologia caracterizada por hiperglicemia, causada por defeitos na secreção e /ou ação da insulina. O DM é considerado um problema de saúde pública mundial e considerando todos os tipos de diabetes, houve um número estimado de 184 milhões de mulheres diabéticas em 2013, esse número deverá subir para 288 milhões até 2030 (IDF, 2015). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), cerca de 7% das complicações gestacionais estão associadas hiperglicemia gestacional.

No período gestacional em mulheres e roedores com diabetes, o ambiente intra-uterino é considerado desfavorável para o desenvolvimento embrionário e fetal. A placenta, órgão importante durante a gestação é comprometida sofrendo impactos decorrentes do aumento da hiperglicemia materna, sendo um obstáculo para uma gravidez bem sucedida (ALBAGHDADI; KAN, 2012; VAMBERGUE; FARJADY, 2011).

O camundongo diabético não obeso (NOD) é um modelo experimental amplamente utilizado em trabalhos por desenvolver um quadro fenotípico de DM1, similar à doença humana (ATKINSON; LEITER, 1999). Apesar da grande quantidade de informação sobre o NOD, o seu desenvolvimento placentário é pouco conhecido, esse conhecimento se torna útil para estudar como a diabetes afeta a placenta e consequentemente a gestação.

O desenvolvimento e manutenção do sistema vascular placentário regulado pela angiogênese são importantes para garantir o sucesso da gestação (BARRIETOS et al., 2009). Além de disfunção placentária, o diabetes tem sido associado com alterações nos mecanismos de proliferação celular, apoptose e angiogênese (MAGEE et al., 2014; AIRES; SANTOS, 2015).

Tendo em vista a importância do diabetes para a saúde materna e neonatal, este estudo propôs estudar placentas a termo de camundongos portadores de DM1, avaliando as alterações placentárias e expressão de marcadores envolvidos na angiogênese, proliferação e apoptose, contribuindo para uma melhor compreensão da fisiopatologia dessa doença durante a gestação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus (DM)

O DM é uma patologia caracterizada por elevados níveis de glicemia, causados por defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Entre os processos patogênicos para o surgimento da doença, encontra-se a destruição autoimune das células β pancreáticas que são as responsáveis por sintetizar e secretar insulina, e as anormalidades que levam a um estado hiperglicêmico resultante do desenvolvimento da resistência da insulina (ADA, 2015).

A insulina é o hormônio responsável por promover a entrada de glicose para os tecidos. Havendo sua produção insuficiente ou inexistente, ocorre o acúmulo de glicose no sangue e as células deixam de receber o aporte energético necessário para a realização de suas funções o que pode levar em morte celular. Esse quadro clínico acarreta em distúrbios no metabolismo dos carboidratos e na síntese de proteínas e lipídeos, resultando em lesões em órgãos como olhos, rins e no sistema vascular (ADA, 2015; IDF, 2013).

Existem três tipos principais de DM, o tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e o DM gestacional (DMG) (ADA, 2015; SBD, 2015). O DM1 é caracterizado pela destruição das células β das ilhotas de Langerhans, usualmente ocorre por processo autoimune ou causa idiopática, resultando na deficiência absoluta da secreção de insulina. No DM2 a hiperglicemia está associada ao fator de resistência à ação da insulina, o corpo é capaz de produzir insulina, mas incapaz de responder aos seus efeitos. Esse tipo representa a maioria dos casos e sua etiologia específica ainda não está claramente estabelecida como no DM1 (ADA, 2015). Ao contrário do DM1, a maioria dos pacientes com DM2 não precisam de insulina diariamente, o controle glicêmico muitas vezes é alcançado por uma dieta controlada, exercício físico ou uso de medicamentos orais. Já o DMG é definido como qualquer intolerância à glicose detectada entre a 24-28ª semana de gestação (ADA, 2015; IDF, 2013; SBD, 2015).

De acordo com dados publicados em 2015, pela Federação Internacional de Diabetes, o DM é uma das doenças mais comuns sendo responsável pela morte de 4,9 milhões de pessoas no mundo por ano, principalmente nos países de renda baixa e média. Estima-se que existam mais de 382 milhões de adultos (8,3%) com diabetes no mundo, sendo que projeções para 2035 sugerem que esse número

possa subir para 592 milhões de pessoas. As complicações clínicas geradas em torno dessa doença, como problemas cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputação de membros inferiores, geram altos custos econômicos para os países. Em 2013, 11% das despesas da saúde em todo mundo foram destinados a casos envolvendo DM (IDF, 2013).

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), estimou-se que haveria 11.933.580 de pessoas com diabetes no ano de 2013. O número de óbitos registrados em 2014 no Brasil, segundo o Departamento de Informática do SUS (DATASUS), indicam 2.920 casos de DM1, 5.768 de DM2 e 47.956 de casos de DM não especificados, sendo as regiões Sudeste e Nordeste com os maiores índices.

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2015), cerca de 7% das complicações gestacionais estão associadas hiperglicemia gestacional. As consequências do diabetes durante a gestação estão associadas a vários tipos de complicações maternas e fetais que contribuem para uma gestação de alto risco (FORSBACH-SÁNCHEZ; TAMEZ-PERÉZ; VAZQUEZ-LARA, 2005; MARUICHI; AMADEI; ABEL, 2012).

2.2 Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e gestação

O DM1 é uma doença crônica caracterizada por deficiência na secreção de insulina resultante da destruição das células β pancreáticas. Sua fisiopatologia é explicada pelo aumento de glicose sanguínea, causado por fatores genéticos e ambientais que vão contribuir para a ativação do sistema imunológico desencadeando o processo de destruição das células β (SBD, 2015). Esse tipo autoimune ocorre em 5-10% das pessoas com DM1 (ADA, 2015). Seu diagnóstico é confirmado pela glicemia plasmática de jejum ≥ 126 mg/dl ou > 200 mg/dl de glicemia casual, em qualquer hora do dia (SBD, 2015).

As modificações no estilo de vida têm contribuído para expansão do DM em diversas faixas etárias, atingindo também mulheres em idade reprodutiva, que conseqüentemente tendem a desenvolver a hiperglicemia antes e durante a gestação (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; IDF, 2013).

O DM é considerado um problema de saúde pública mundial e considerando todos os tipos de diabetes, havia uma estimativa de 184 milhões de mulheres diabéticas em 2013 e este número deverá subir para 288 milhões até 2030 (IDF, 2015). Com relação aos nascimentos a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2015), estima que mais de 20 milhões dos nascimentos em 2015 tenham ocorrido a partir de gestações com incidência de hiperglicemia relacionada ao diabetes.

O DM1 é menos comum, mas a estimativa dos casos aumenta cerca de 3% a cada ano. O Brasil foi considerado o terceiro país com o maior número de crianças diagnosticadas com DM1, por consequência futuramente haverá aumento de mulheres com DM1 em idade reprodutiva que estarão sujeitas a complicações diabéticas durante a gravidez (IDF, 2015, ADA, 2015). O DM em mulheres grávidas está associado com o risco aumentado de morbidade materna e neonatal (VAMBERGUE; FAJARDY, 2011).

Antes do descobrimento da insulina em meados do século 20, as mulheres com DM1 eram contraindicadas a gravidez, pois apresentavam problemas graves de saúde (NEGRATO et al., 2010). Atualmente, com os avanços clínicos disponíveis, o número de mulheres grávidas com DM1 é crescente (AIRES; SANTOS 2015). Entretanto, as taxas de complicações maternas e fetais continuam altas. Entre as complicações mais frequentes para o feto estão malformações congênitas, restrição de crescimento intra-uterino, macrossomia e morte fetal. Já as intercorrências maternas são: abortamentos espontâneos, hipertensão arterial, pré-eclâmpsia, partos prematuros e infecções (GOLBERT; CAMPOS, 2008).

Por tanto, o diagnóstico e controle da doença deve-se iniciar antes mesmo da concepção, tentando manter os níveis glicêmicos próximos do normal na tentativa de minimizar os riscos a saúde da mãe e do feto (GOLBERT; CAMPOS, 2008). Com o objetivo de entender mais claramente o diagnóstico, patologia e tratamento do diabetes, modelos animais têm sido desenvolvidos. Entre os modelos experimentais, para DM1 o camundongo diabético não obeso (NOD) é um dos mais estudados (ALONSO et. al., 2015; ATKINSON; LEITER, 1999; BUSCHARD et al., 2001; LEITER; HERRATH, 2004).

2.3 Camundongos diabéticos não obesos (NOD)

No ano de 1974, no Laboratório de Osaka-Japão, durante um experimento os pesquisadores notaram uma fêmea da linhagem CTS (derivada da JLC-1CR) que apresentava sinais de poliúria e glicosúria. A reprodução da linhagem desta fêmea diabética levou ao surgimento da linhagem de camundongo diabético não obeso (NOD). O quadro hiperglicêmico iniciou-se com 90 dias, apresentando valores médios da glicemia de jejum de 225 mg/dl no começo da constatação do diabetes, aumentando com o avanço da idade (AOKI et al., 2005; PAVIN; ZOLLNER, 1994).

Essa linhagem é considerada modelo ideal no estudo do DM1 por apresentar um genoma bem definido que induz o desenvolvimento espontâneo de um quadro fenotípico de DM1 (ATKINSON; LEITER, 1999; BUSCHARD et al., 2001; HOMO-DELARCHE, 2001; LEITER; HERRATH, 2004). Esses camundongos apresentam uma produção de insulina insuficiente, pois as células β pancreáticas sofrem destruição autoimune gradativa nas primeiras semanas de vida do animal (ALBAGHDADI; KAN, 2012). A destruição autoimune acontece por infiltrado leucocitário crônico (insulite) do tipo linfomononuclear, em geral sendo observado nas ilhotas pancreáticas de forma semelhante à observada no homem (AOKI et al., 2005).

O sistema imunológico é o responsável por essa destruição quando se comporta de maneira anormal e ataca as células pancreáticas. No infiltrado aparecem linfócitos, macrófagos e algumas células “natural killer”. Os linfócitos divididos em linfócitos B e linfócitos T (CD4+ e CD8+) são os principais efetores da infiltração. O linfócito T (CD4+) libera citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) que podem iniciar a resposta autoimune (KIRSTEN; SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2010; PAVIN; ZOLLNER, 1994).

O desenvolvimento da doença é diferente entre machos e fêmeas, nos machos acontecendo mais tardiamente e a incidência é maior nas fêmeas, o que sugere a participação de hormônios sexuais (BALDA; SILVA, 1999). De acordo com Delovitch e Singh (1997) o diabetes atinge primeiramente as fêmeas com incidência de 80-90% e nos machos com 10-40%. O surgimento da doença é dependente das

condições ambientais, quanto mais livre de patógenos maior incidência do diabetes e mais cedo o seu diagnóstico (KIRSTEN; SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2010).

2.4 Desenvolvimento da placenta em camundongos

O período da implantação em camundongos acontece no 5º dia de gestação (dg), quando o blastocisto chega à região uterina e se implanta no endométrio. Em roedores, a placenta tem uma forma discoide e é classificada do tipo hemocorial, onde células trofoblásticas entram em contato direto com o sangue materno, permitindo trocas metabólicas entre eles. A placenta se desenvolve a partir da diferenciação de células derivadas do blastocisto e células maternas (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). Desde modo, células derivadas de ambos formam a interface materno-fetal fundamental para o desenvolvimento fetal e o sucesso da gestação.

Durante a implantação, o trofoectoderma aglomerado de células indiferenciadas que circunda a camada externa do blastocisto, se diferenciam no trofoblasto polar e trofoblasto mural. Na região mural ocorre a diferenciação em quatro tipos celulares; células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas, células glicogênicas e sinciciotrofoblasto (**Figura 1**) (SOARES et al., 2012), que contribuem para o processo de formação da placenta por volta no 9º dg. A massa interna no blastocisto dará origem ao embrião e aos folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) (CROSS; WERB; FISHER, 1994).

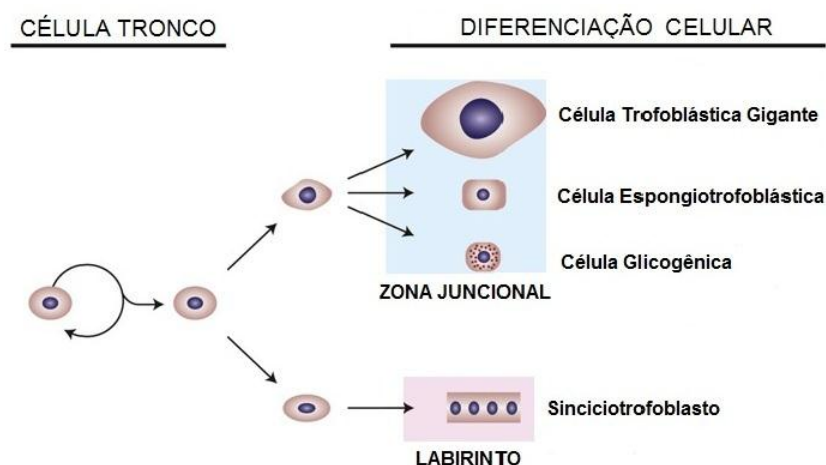


Figura 1 – Células do trofoectoderma e suas linhagens diferenciadas. Figura adaptada de Soares et al. 2012.

A placenta é constituída por três regiões distintas. A região da decídua, parte materna da placenta formada por células decíduais e células “natural killer” uterinas, entre outras células que serão importantes na implantação e defesa imunológica do embrião. A zona juncional, região localizada na interface materno-fetal formada por células trofoblásticas gigantes, células espongiotrofoblásticas e por células glicogênicas. Com exceção das células glicogênicas, as outras células dessa região sintetizam e secretam hormônios, possuindo função endócrina.

A região do labirinto composto por vilosidades, com a função de trocas entre o espaço sanguíneo materno e embrionário (ROSANT; CROSS, 2001) (**Figura 2**). O labirinto contém os sinusóides maternos e os septos trofoblásticos, os quais são compostos de um epitélio trofoblástico trilaminar e capilar fetal. Os sinusóides maternos sem revestimento endotelial preenchidos com sangue se localizam entre os septos trofoblásticos. O epitélio trofoblástico, em contato direto com o sangue materno, é chamado citotrofoblasto, e mais duas camadas de sinciciotrofoblasto circundam o endotélio fetal (**Figura 2**) (FURUKAWA et al., 2011; SUN et al., 2013).

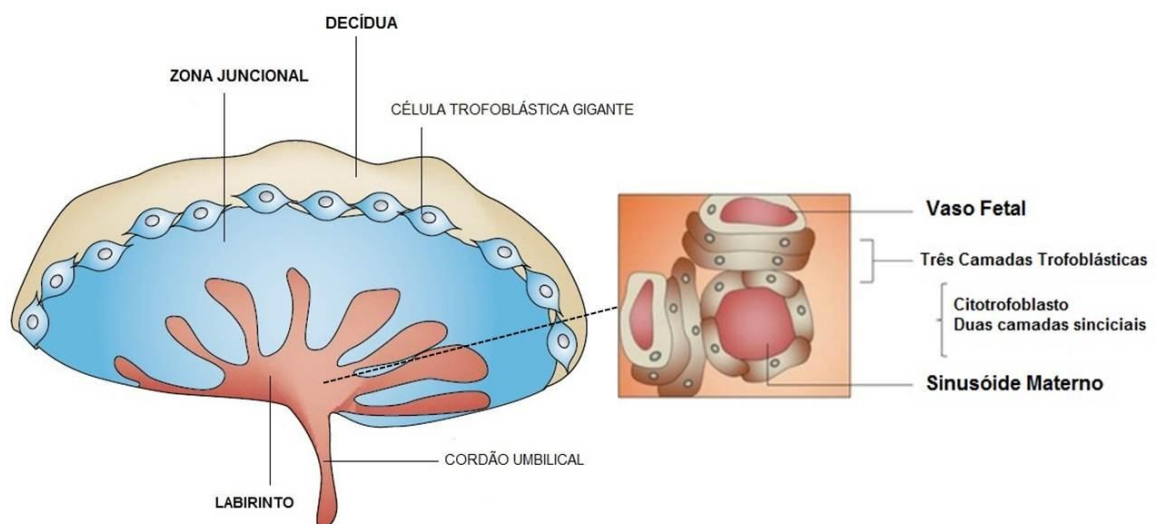


Figura 2 - Regiões da placenta de camundongo: decídua, zona juncional (área representada em azul) delimitada por suas células trofoblásticas gigantes, e região do labirinto com os septos trofoblásticos formado pelas três camadas trofoblásticas. Figuras adaptadas de Rosant e Cross, 2001 e Sun et al. 2013.

A placenta é um órgão vital responsável por suprir todas as necessidades fetais. Os nutrientes e oxigênio são transportados para o feto através dela, além de desenvolver outras funções importantes para o desenvolvimento gestacional (FURUKAWA et al., 2014). É uma estrutura totalmente vascularizada e de circulação independentes entre o feto e a mãe. No caso de DM, a hiperglicemia é capaz de causar modificações vasculares que alteram os eventos naturais durante a implantação e placentação prejudicando o desenvolvimento da placenta até o seu termo. As alterações vasculares comprometem a sobrevivência e o crescimento do feto (VAMBERGUE; FARJADY, 2011; ZORN et al., 2011).

2.5 Alterações placentárias ocasionadas pelo diabetes

A estrutura e função da placenta são alteradas no diabetes, e a severidade dessas modificações parece se correlacionar com o grau de controle metabólico (BJORK; PERSSON, 1984; SINGER et al., 1984). Em placentas de roedores com hiperglicemia, nota-se o espessamento e desorganização das camadas trofoblásticas devido ao aumento das células glicogênicas e das células trofoblásticas gigantes (FARIAS et al., 2014; GEWOLB et al., 1986; PADMANABHAN ; YU et al., 2008).

O desenvolvimento das artérias espiraladas é limitado e número reduzido de células “natural killer” uterinas que desenvolvem funções na produção dos fatores angiogênicos. Essas alterações também causam prejuízos na oxigenação e na oferta de nutrientes para o feto e elevam as taxas de desenvolvimento fetal anormal e morbidade perinatal (BURKE et al., 2007; SEAWARD; BURKE; CROY, 2010). As alterações placentárias inibem a angiogênese vilositária através da liberação desregulada de fatores angiogênicos, o que contribui significativamente para a deficiência das trocas materno-fetais e restrição do crescimento intra-uterino (MACINTOSH et al., 2006).

As células trofoblásticas possuem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares que facilitam as interações vasculares. O correto desenvolvimento da circulação placentária depende da coordenação entre a proliferação e diferenciação dessas células (SOARES et al., 2012). Além de proliferação e diferenciação celulares, a eliminação de células inviáveis por morte

celular programada é necessária para um adequado desenvolvimento placentário (SMITH; BAKER; SYMONDS, 1997; STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005).

Estudos relataram aumento da proliferação celular em um estado hiperglicêmico no 17º dia de gestação (dg), com intensa marcação do Ki-67 e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) nas regiões da zona juncional e do labirinto em placentas de ratos e camundongos (ACAR et al., 2008; ZORN et al., 2011). Esse aumento de proliferação é um indicativo de crescimento desregulado, o que pode explicar o fato das placentas diabéticas terem aumento de tamanho e peso (ZORN et al., 2011). Em humanos, foi encontrado redução da expressão de inibidores do ciclo celular (p27, p57 e Caspase-3) e aumento da expressão dos marcadores de proliferação (Ciclina D3, PCNA e Ki-67) nas vilosidades das placentas de mulheres com DMG (MAGEE et al., 2014; UNEK et al., 2014). Entre os marcadores utilizados para avaliação da proliferação celular, a Histona-3 é uma proteína fosforilada durante a condensação dos cromossomos e progressão no ciclo celular durante a mitose (BARSKI et al., 2007).

2.6 Angiogênese placentária

Durante a gestação, mudanças na circulação placentária vão acontecer, a fim de permitir o aumento do fluxo sanguíneo para atender as demandas do feto em crescimento. Assim, o desenvolvimento e manutenção do sistema vascular placentário regulado pela angiogênese, são importantes para garantir o sucesso da gestação (BARRIETOS et al., 2009).

O funcionamento e estabelecimento do sistema vascular para uma oferta adequada de nutrientes e oxigênio dependem de dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese consiste na formação de uma rede primitiva de vasos; por outro lado, a angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de preexistentes (PIETRO et al., 2010). Esses processos desempenham papel essencial durante as alterações uterinas associadas à gestação, assegurando que o embrião receberá todo suprimento necessário para o seu desenvolvimento e são controlados por fatores pró e anti-angiogênicos e seus receptores (BARRIETOS et al., 2009).

O endométrio, a decídua e a placenta são ricas fontes de fatores angiogênicos (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987) como o fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), os quais são importantes na regulação da formação de vasos placentários e nas adaptações da vascularização endometrial durante a gestação (ZYGMUNT et al., 2003). Esses fatores aumentam a permeabilidade dos vasos, estimulam a degradação proteolítica da matriz extracelular (lâmina basal e reticular) por proteases específicas (ativadores de collagenases e plasminogênio) e causam proliferação e migração das células endoteliais (BARRIETOS et al, 2009; REYNOLDS; KILLILEA; REDMER, 1992; RISAU, 1997).

O VEGF é um mitógeno que consiste em um fator de sobrevivência para as células endoteliais, agindo diretamente na permeabilidade vascular. A resposta celular mediada pelo VEGF ocorre por sua ligação com receptores de tirosina quinase (VEGFR), localizados na superfície celular (SZPERA-GOZDZIEWCZ; BREBOROWICZ, 2014). Sua família é formada por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, fatores 1 e 2 de crescimento placentário (PlGF-1 e PlGF-2), seus receptores VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR em humanos e / Flk-1 nos camundongos), VEGFR-3 (Flt-4) e co-receptores, como a Neuropilina (Npr1 e Npr2) (AHMED et al., 2000; ANDRAWEERA et al., 2012).

Durante a gestação, o VEGF-A e o PlGF são os responsáveis pelo desenvolvimento vascular placentário, através de KDR e Flt-1, sendo a hipóxia seu potente estimulador. Em humanos, são expressos nas células trofoblásticas, trofoblasto extraviloso e endotélio vascular (ANDRAWEERA et al., 2012). Na gestação em ratos, o VEGF é expresso no trofoblasto e no embrioblasto e após implantação nas células trofoblásticas gigantes (JAKEMAN et al., 1993). Um estudo em camundongos observou que alterações genéticas para VEGF, Flt-1 e Flk-1 ocasionaram morte embrionária (CARMELIET et al., 1996), sugerindo a importância deste fator para o desenvolvimento e manutenção da placenta. O déficit de produção dessas moléculas pode resultar em vascularização anormal (BARRIETOS et al., 2009).

2.7 Papel da endoglina na angiogênese

A superfamília do TGF- β é formada por proteínas, que incluem os TGF- β 1, β 2, β 3, as activinas (A e B), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs 1-10). Entre os receptores de TGF- β estão os de superfície tipo I (T β R1), os tipo II (T β R2), localizados em células endoteliais, musculares lisas e outros tipos celulares e os co-

receptores de tipo III (T β R3) como o betaglicano e a endogлина (ALVAREZ-MUÑOS et al., 2010). Essa classe é expressa em quase todas as células e são responsáveis pela regulação de processos celulares, atuando na diferenciação, migração e proliferação das células, e em processos fisiológicos como na angiogênese, importantes para o desenvolvimento embrionário e estado adulto (GREGORY et al., 2014).

Durante a angiogênese tem-se a participação da endogлина como co-receptor do fator transformante beta (TGF- β), cuja expressão é aumentada em condições que alterem a estrutura vascular, como lesão tecidual e inflamação (PERLINGEIRO, 2007; SASMITO et al., 2015). A endogлина é uma glicoproteína hemodimérica transmembranar, também conhecida como CD105, que contém um domínio extracelular e um domínio intracelular. Há descrito duas formas isoformas de CD105, uma transmembranar e outra solúvel resultante da clivagem do domínio extracelular (DUFF et al., 2003). Os principais ligantes da família TGF- β que interagem com o CD105, são as proteínas TGF- β 1 e TGF- β 3, pela interação com os receptores T β R1 e/ou T β R2. Portanto, o CD105 pode modular as respostas a diversos ligantes de uma maneira dependente dos tipos de ligante, do tipo celular e do tipo de receptor (ALVAREZ-MUÑOS et al., 2010).

Nas células endoteliais, o sistema de transdução de sinal é mediado pelas vias de sinalização ALK5 e ALK1, com efeitos opostos sobre a migração e proliferação dessas células. Depois que o ligante ativa os receptores, os sinais são traduzidos da membrana para o núcleo pela fosforilação de proteínas intracelulares (Smads), sendo Smad1, Smad5, e Smad8 na via ALK5, e Smad2 e Smad 3, ALK1 (**Figura 3**). A função do CD105 na sinalização BMP ainda é pouco conhecida (GREGORY et al., 2014). O CD105 desempenha um papel importante na morfogênese vascular. Isso fica evidente em estudo com ratos nocaute para CD105, que morreram durante a gestação apresentando alterações no saco vitelino e no coração, resultado de prejuízos na angiogênese (DUFF et al., 2003).

Durante a gestação em camundongos, foi observada alta expressão de CD105 nas células endoteliais dos vasos sanguíneos maternos na zona vascular da decídua basal e nos vasos fetais do labirinto no 12º dg (KRUSE; HALLMANN, BUTCHER, 1999). Essas evidências sugerem a participação desse receptor na

intensa angiogênese, necessária na interface materno-fetal durante o desenvolvimento da placenta. A placenta humana é uma abundante fonte de CD105. Estudos imunohistoquímicos revelaram a expressão desta glicoproteína no sinciciotrofoblasto da placenta a termo e durante toda a gestação. Também é expressa transitoriamente no trofoblasto extraviloso e nas vilosidades de ancoragem (GREGORY et al., 2014).

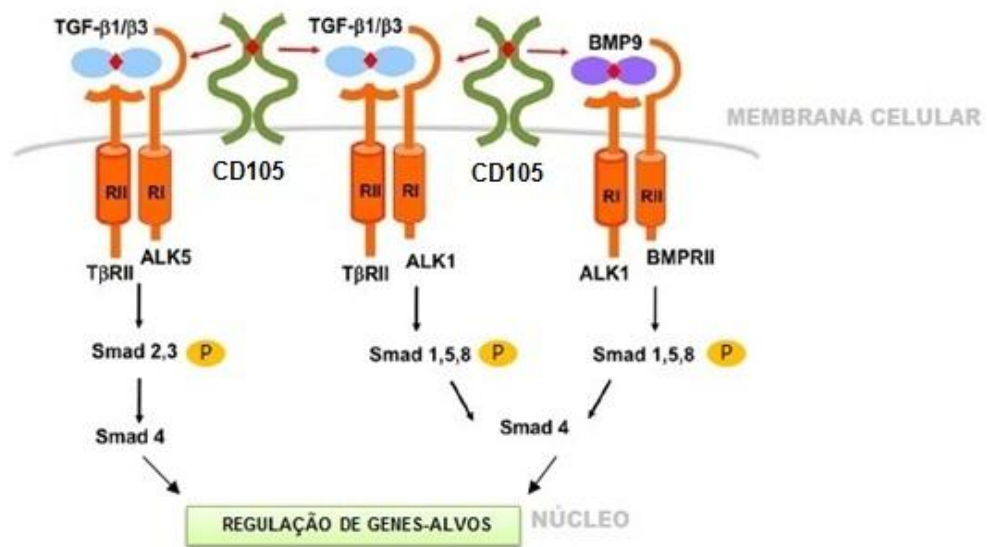


Figura 3 - Esquema das vias de sinalização de CD105 com o TGF-β, modulando a proliferação das células endoteliais. Figura adaptada de Gregory et al. 2014.

Mulheres com DM1, que desenvolveram posteriormente pré-eclâmpsia, apresentaram altos níveis plasmáticos de endoglin solúvel (sEng) no segundo trimestre de gestação indicando uma possível atuação nas alterações placentárias resultantes do diabetes e pré-eclâmpsia (HOLMES et al., 2013). Essa proteína na circulação sanguínea, na sua forma solúvel, possuem efeitos anti-angiogênicos, inibindo o complexo TGF-β. Esse processo priva a interação desse fator angiogênico com as células endoteliais, prejudicando a proliferação dessas células, causando disfunções endoteliais. Um dos mecanismos de descontrole vascular, é a inibição do complexo de ativação da enzima síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS), o que provoca menor produção do óxido nítrico (NO) (MEDELA et al., 2010). Portanto, aumento desse fator angiogênico na circulação se correlaciona com a gravidade dessas patologias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da hiperglicemia nas alterações placentárias em camundongos diabéticos não obesos (NOD).

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a morfologia das placentas de camundongos Balb-c, NOD normoglicêmicos e hiperglicêmicos no 19,5 dg.
- Avaliar a expressão proteica de CD105, Caspase-3 e Histona-3 nas placentas de camundongos NOD normoglicêmicos e hiperglicêmicos e Balb-c no 19,5 dg, por meio de reação imunohistoquímica.
- Avaliar a concentração proteica de CD105, PIGF-2 e VEGF-A no soro e nas placentas de camundongos NOD normoglicêmicos e hiperglicêmicos e Balb-c no 19,5 dg, por meio de ensaio imunoenzimático.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e protocolo experimental

Os camundongos diabéticos não obesos (NOD) /Unib foram obtidos do Cemib - Unicamp (aprovado CEUAIB- Instituto Butantan, Protocolo nº 1239/14) com peso médio de 20 ± 2 g. Foram utilizadas 30 fêmeas NOD que foram acompanhadas até o período de diagnóstico de diabetes tendo a glicemia sem jejum monitorada uma vez por semana no período da manhã. Após diagnóstico de diabetes realizamos a separação dos grupos experimentais em hiperglicêmico (grupo NODH, glicemia sem jejum $\geq 270,0$ mg/dl, 22 ± 2 g, n=6) e normoglicêmico (grupo NODN, glicemia sem jejum $< 180,0$ mg/dl, 25 ± 2 g, n=6) e 8 machos NOD normoglicêmicos (para acasalamento, glicemia sem jejum $< 180,0$ mg/dl, 30 ± 2 g, n=8). Devido às alterações genéticas do grupo NOD, foi necessária a utilização de um grupo de camundongo Balb-c normoglicêmico, utilizamos 6 fêmeas (25 ± 2 g) e 4 machos (30 ± 2 g). A padronização e a verificação da glicemia dos grupos foi realizada de acordo com Albaghdadi e Kan (2012).

Os animais foram identificados e acondicionados em gaiolas de polipropileno sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) e umidade (45 – 75%) e ciclo de 12 horas de claro/escuro no biotério do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan. Os animais receberam água filtrada e ração comercial em regime *ad libitum* por todo o período experimental. Para o acasalamento, foram acondicionadas duas fêmeas e um macho durante o período da noite.

As fêmeas acasaladas foram alojadas separadamente durante o período gestacional. A contagem do período gestacional iniciou-se com 0,5 dia na manhã de confirmação do acasalamento, constatado pela presença do “plug” vaginal (**Figura 4**), que é um tampão mucoso que fica visível na vulva após o coito. Na manhã da confirmação do acasalamento verificamos o peso e a glicemia das fêmeas acasaladas. Foram utilizadas placentas do dia 19,5 dias de gestação (dg), período importante já que se refere à placenta a termo.

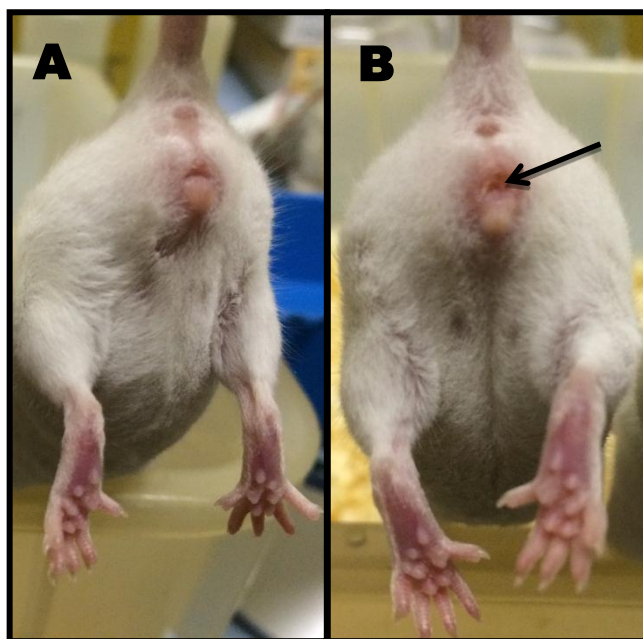


Figura 4 - Presença do “plug” vaginal em fêmeas Balb-c: (A) fêmea Balb-c sem a presença do tampão e (B) tampão presente (seta preta) (SANTOS, A. C. V 2015).

4.2 Coleta de placentas murinas e eutanásia dos animais

No 19,5 dg verificamos o peso e a glicemia das fêmeas prenhas dos grupos NODN, NODH e Balb-c, em seguida, foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de Xilazina 20 mg/kg (Anasedan - Sespo) e cloridrato de Cetamina 80 mg/Kg (Dopalen - Sespo). Foram recolhidas amostras de sangue das fêmeas com o auxílio de um capilar do plexo orbital e colocadas em eppendorf seco, em seguida, as amostras foram centrifugadas (1800 rpm x 10 min) e o soro foi separado e armazenado a -80 °C até à sua utilização. Após as fêmeas serem laparotomizadas os cornos uterinos foram removidos para a coleta das placentas, e realizamos a contagem e peso dos fetos e das placentas. Logo após a retirada dos cornos uterinos, os animais foram eutanasiados por injeção intracardíaca de 120,0 mg/kg de Nembutal (Tiopental sódico). De acordo com o guia de boas práticas para eutanásia do CFMV (2013), a eutanásia dos fetos foi realizada por decapitação precedida de anestesia por hipotermia. As amostras de placenta foram fixadas em paraformaldeído 4% e o restante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análises posteriores.

4.3 Histoprocessamento e análise morfológica

Para os procedimentos histológicos e imunohistoquímicos, as placentas foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e lavadas em água destilada e mantidas em álcool 70% *overnight*. No dia seguinte, o material foi desidratado por uma bateria crescente de etanol, sendo imersos durante 30 min em dois banhos pelo etanol 95% e em 4 banhos no etanol 100% durante 60 min e diafanizados em 3 banhos consecutivos de Xilol durante 30 min cada. Após a desidratação e diafanização o material foi embebido em parafina contendo Merk (Histosec) em três embebições com parafina pura durante 1 h cada a 60°C. Todo o processamento foi realizado no processador automático de tecidos (Leica – TP1020). O material foi então incluído em formas de alumínio contendo parafina pura, e mantido à temperatura ambiente após ser devidamente identificado com o número do material processado.

Cortes de 5 μm de espessura foram obtidos em um micrótomo rotativo (Leica RM 3245) e coletados em lâminas histológicas. Para a análise morfológica, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H.E) e com ácido periódico de Schiff (PAS). A digitalização das lâminas foi realizada no equipamento 3D Histech Pannoramic MIDI e as imagens capturadas com o programa Pannoramic Viewer.

4.4 Mensuração das regiões

A mensuração da zona juncional (ZJ) e do labirinto (L) foi realizada usando o programa Imagej 1.50, em uma área de teste que compreende um sistema de pontos equidistantes, com um total de 1000 μm^2 . Foram analisados dois cortes não consecutivos e aleatórios de cada placenta (3 animais por grupo). Dessa forma, o número total de pontos da área de interesse foi estimado, permitindo o cálculo da razão entre a área total da placenta em relação a área da ZJ ou L, sendo expressa como uma porcentagem.

4.5 Imunohistoquímica

Para esta análise, cortes de 5 μm foram obtidos em micrótomo e aderidos à lâminas de vidro silanizadas. Para a reação de imunoperoxidase, após desparafinização e hidratação dos cortes, realizou-se a recuperação dos antígenos em tampão citrato 0,01M pH 6.0 em forno micro-ondas de 450 Watts, por 15 min, após esse tempo as lâminas ficaram em repouso por 30 min em temperatura

ambiente. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com peróxido de hidrogênio a 3% em Metanol por 15 min.

Para o bloqueio dos sítios inespecíficos, foram realizados dois bloqueios, o primeiro utilizado foi uma solução de Pierce (Thermo Fisher Scientific-37572) por 1 h, o segundo foi com leite desnatado a 10% (diluição em água destilada) por 30 min, os dois bloqueios realizados em câmara úmida e temperatura ambiente. Para o anticorpo monoclonal realizamos apenas o bloqueio com leite.

A incubação dos anticorpos primários foi realizada durante uma noite a 4°C em câmara úmida (**Tabela 1**). No dia seguinte, foram acrescentados o anticorpo secundário anti-coelho (KPL 074-1506) conjugado com peroxidase, durante 1 h, à temperatura ambiente. Na **Tabela 1** a descrição das diluições do anticorpo secundário para cada anticorpo primário utilizado. Entre cada etapa do processo foram realizadas lavagens com tampão TBS (Sigma). A atividade da peroxidase foi detectada utilizando-se diâmino benzidina (DAB) como cromógeno (Sigma). Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer (Synth). Nas reações controle foi omitido o anticorpo primário. Ao final das reações, as lâminas foram montadas com lamínula de vidro e resina sintética (Entellan, Merck).

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados para reações imunohistoquímicas e suas diluições, e as diluições do anticorpo secundário referente a cada anticorpo primário-Aracaju-2016.

Proteína	Anticorpo	Empresa	Diluição do primário*	Diluição do secundário*
CD105	Anti-CD105, coelho policlonal	Imuny/IM-0572	1:200	1:250
Caspase-3	Anti-Caspase-3 ativa, coelho policlonal	Imgenex/IMG-5700	1:2000	1:500
Histona-3	Anti-Histona-3, coelho monoclonal	Abcam/AB-177218	1:200	1:250

* Diluição em TBS 0,02 M, pH 7.4.

4.5.1 Análise quantitativa dos marcadores

As lâminas das reações de imunoperoxidase foram digitalizadas no equipamento 3D Histech Pannoramic MIDI no setor de Patologia da UNESP. As imagens foram capturadas com o programa Pannoramic Viewer em uma escala de

barra de 100 μm dos cortes submetidos às reações de imunohistoquímica de cada animal pertencente aos grupos NODN, NODH e Balb-c foram quantificadas, utilizando-se o programa ImageJ (v. 1,45u, NIH).

Foram geradas 10 imagens da zona juncional e 10 imagens do labirinto de pelo menos dois cortes não sequenciais com intervalo de 20-30 μm entre eles para cada anticorpo analisado de todos os animais dos grupos. Com o auxílio da ferramenta *colour deconvolution* do programa de análises ImageJ, usando o plug-in, a cor vermelha (coloração imunohistoquímica positiva) foi isolada em cada imagem. A área percentual de cada imagem que apresenta o nível de limiar selecionado de coloração foi então quantificada. Os valores foram expressos como a razão entre a área da coloração marrom (DAB) positivo e a superfície total do campo de referência. Na zona juncional, considerou-se a coloração marrom nas células glicogênicas, espongiotrofoblásticas e trofoblásticas gigantes. No labirinto, quantificaram-se as células do sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto com reação positiva.

4.6 Ensaio Imunoensimático

As placentas foram segmentadas em pedaços de 1-2 mm e lavadas com solução PBS. Depois o material foi homogeneizado em PBS e foi acrescentada a mesma quantidade do tampão de lise celular (R & D Systems/895347). O material foi homogeneizado em temperatura ambiente durante 30 min com agitação suave. Após este processo, foi filtrado (filtro de 25 mm), dividido em alíquotas e armazenado a -80°C até à sua utilização.

As concentrações das proteínas CD105, Fator de Crescimento Placentário 2 (PlGF-2) e o Fator A de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF-A) foram determinadas utilizando um ensaio imunoenzimático com microesferas do tipo multiplex (Luminex). Nesta análise, 50 μl das amostras de placenta e soro foram analisadas usando um kit disponível comercialmente de *Mouse Premixed Multi-Analyte Kit* (R & D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma placa com 96 poços foi pré-umedecida com tampão de lavagem. Micro-esferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os 3 alvos diferentes analisados foram adicionadas aos poços.

Amostras e padrões foram pipetados nos poços e incubados por 1h em temperatura ambiente no agitador a 800 ± 50 rpm. Os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente (estreptavidina-PE) foi adicionada às microesferas e incubadas por 30 minutos. Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços com as microesferas (mínimo de 100 por análise) uma solução tampão *wash buffer* (Luminex®, R & D Systems, Minneapolis, EUA) para serem analisadas no analisador de microesferas (Luminex). As concentrações de proteína foram analisadas utilizando o MILLIPLEX Analyst 5.1 software (Merck Millipore, Billerica, EUA).

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram tabelados e analisados no programa Graphpad, Version 5.0. A análise dos dados foi realizada pelas comparações dos grupos com distribuição paramétrica utilizando-se o teste *t* de Student ou a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Todos os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, considerado como nível crítico para significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Diagnóstico do diabetes e manutenção das fêmeas NOD

A ocorrência de hiperglicemia foi diagnosticada inicialmente aos quatro meses de vida em algumas fêmeas NOD, com maior incidência após os cinco meses. No total, 30 fêmeas foram adquiridas, sendo que 9 tornaram-se diabéticas e formaram o grupo NODH, as fêmeas que não desenvolveram o diabetes ficaram no grupo NODN. Nas fêmeas diabéticas verificou-se a ocorrência de hiperglicemia severa (≥ 400 mg/dl) na segunda semana após o diagnóstico e a partir da terceira semana observou-se queda do estado geral de saúde com perda de massa muscular, poliúria e evidente distensão abdominal, duas fêmeas foram a óbito. O estado clínico favoreceu a permanência dessas fêmeas em anestro (período de inatividade sexual), o que dificultou a reprodução dos animais.

5.2 Avaliação do peso e glicemia materna

O peso corporal das fêmeas foi menor no 0,5 dia de gestação (dg) entre o grupo NOD hiperglicêmico (NODH) com o NOD normoglicêmico (NODN) e o Balb-c (**Tabela 2**). Durante o período gestacional as fêmeas dos grupos ganharam peso de forma homogênea.

Tabela 2 - Peso corporal das fêmeas (g) avaliado no dia 0,5 e 19,5 de gestação (dg) dos grupos Balb-c, NODN (normoglicêmico) e NODH (hiperglicêmico). Aracaju-2016.

Dia de Gestação (dg)	Balb-c (n=4)	NODN (n=4)	NODH (n=3)
0,5 dg	27,0 $\pm$ 0,7	27,7 $\pm$ 0,9	23,4 $\pm$ 0,6*
19,5 dg	41,7 $\pm$ 1,2	40,0 $\pm$ 1,2	36,6 $\pm$ 0,3

Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; teste-t; *p < 0,05.

A glicemia das fêmeas Balb-c e NODN foi diferente no 0,5 dg (93 $\pm$ 10,81 vs 134 $\pm$ 16,67 mg/dl, p < 0,001) da mesma maneira não houve diferença significativa no 19,5 dg desses grupos (102 $\pm$ 9,67 vs 118 $\pm$ 6,84 mg/dl, p < 0,001). No entanto, a

glicemia do grupo NODH ($516 \pm 16,67$ mg/dl) foi significativamente maior que os demais nas duas avaliações (**Figura 5**).

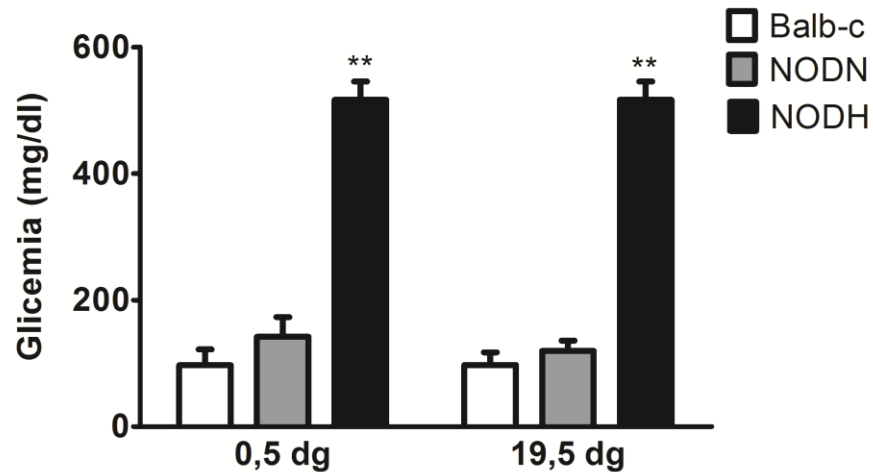


Figura 5 - Médias glicêmicas avaliadas no 0,5 dg e 19,5 dg das fêmeas do grupo Balb-c $n=4$, NODN (normoglicêmico) $n=4$ e NODH (hiperglicêmico) $n=3$. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; teste-t; ** $p < 0,001$.

5.3 Avaliação do peso fetal e placentário

O peso fetal do grupo NODH foi menor comparado ao Balb-c ($989 \pm 68,3$ vs $1290 \pm 57,3$ mg, $p < 0,05$) não havendo diferença estatística com relação ao grupo NODN, já o peso placentário, foi maior comparado ao grupo Balb-c e NODN ($190 \pm 26,1$ vs $155 \pm 8,3$ mg, $p < 0,0001$; $130 \pm 4,1$ mg, $p < 0,001$) (**Figura 6**).

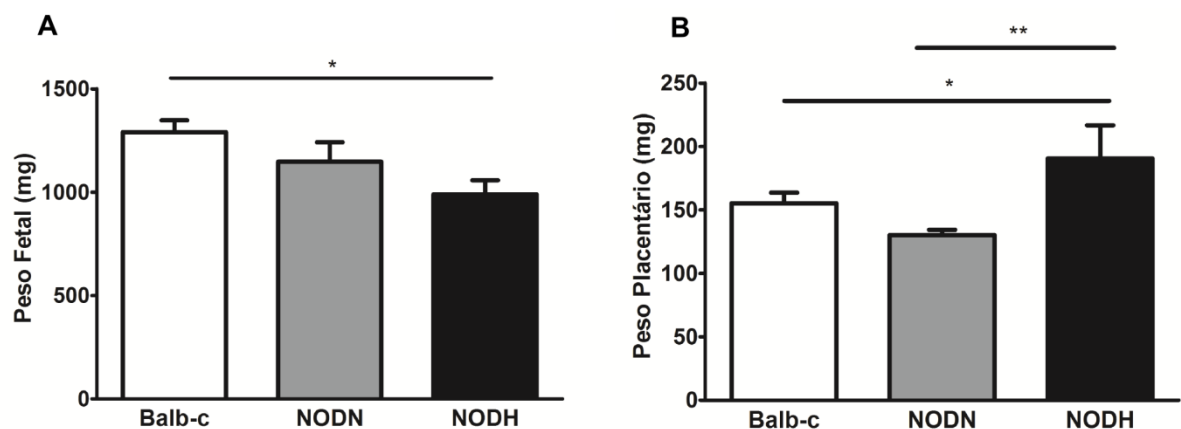


Figura 6 - Médias do peso fetal (mg) (**A**) e peso placentário (mg) (**B**) do grupo Balb-c, NODN (normoglicêmico) e NODH (hiperglicêmico), no dia 19,5 de gestação. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; ANOVA, pós teste de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$; $n=8$.

5.4 Avaliação morfológica

As placentas dos animais normoglicêmicos dos grupos Balb-c e NODN foram observadas com três regiões definidas: a decídua, a zona juncional e o labirinto (**Figura 7A-B**). As placentas dos animais hiperglicêmicos (NODH) observou-se as mesmas regiões das placentas dos animais dos grupos Balb-c e NODN. No entanto, houve aumento de espessura da zona juncional e redução do labirinto (**Figura 7C-D-E**). Notou-se na zona juncional uma organização celular mista com a presença das células espongiotrofoblásticas (CEs), células trofoblásticas gigantes (CTGs), e células glicogênicas (CGs). As CTGs são células grandes com extensões citoplasmáticas e separam a zona juncional da decídua (**Figura 7F**). As células glicogênicas (CGs) possuem núcleos pequenos e citoplasma vacuolado (**Figura 7F**). As CEs podem ser monocleadas ou binucleadas e nota-se basofilia citoplasmática (**Figura 7G**).

No grupo NODH, na zona juncional, observou-se CTGs com condensação nuclear (**Figura 7H**) e predominância de CEs com aparente aumento de vacuolização citoplasmática e retração celular (**Figura 7H**). Além disso, foi observado nas CEs gotículas eosinofílicas citoplasmáticas (**Figura 7I**) e CGs áreas com degeneração cística (**Figura 7I**).

A região do labirinto é caracterizada por um arranjo tortuoso de vasos maternos (VM) sem revestimento endotelial e vasos fetais com endotélio (E) (VF) (**Figura 8A-1**). O citotrofoblasto (CT) pode ser visualizado pelo grande núcleo esférico e nucléolo proeminente enquanto o sinciotrofoblasto (SC) circunda o endotélio dos VF (**Figura 8A-2**). Na organização do labirinto foi observado as mesmas características nos grupos Balb-c e NODN. As nossas observações no grupo NODH indicaram uma redução da espessura do labirinto e VM e VF mais dilatados, que não foi observado aspecto sinuoso característico e sim um padrão mais retilíneo (**Figura 8B-1**). No grupo NODH Foi observado o citotrofoblasto (CT) com núcleo maior e com basofilia citoplasmática mais proeminente. Observou-se vacuolização citoplasmática no SC e espessamento dos septos trofoblásticos (ST) (**Figura 8B-2**).

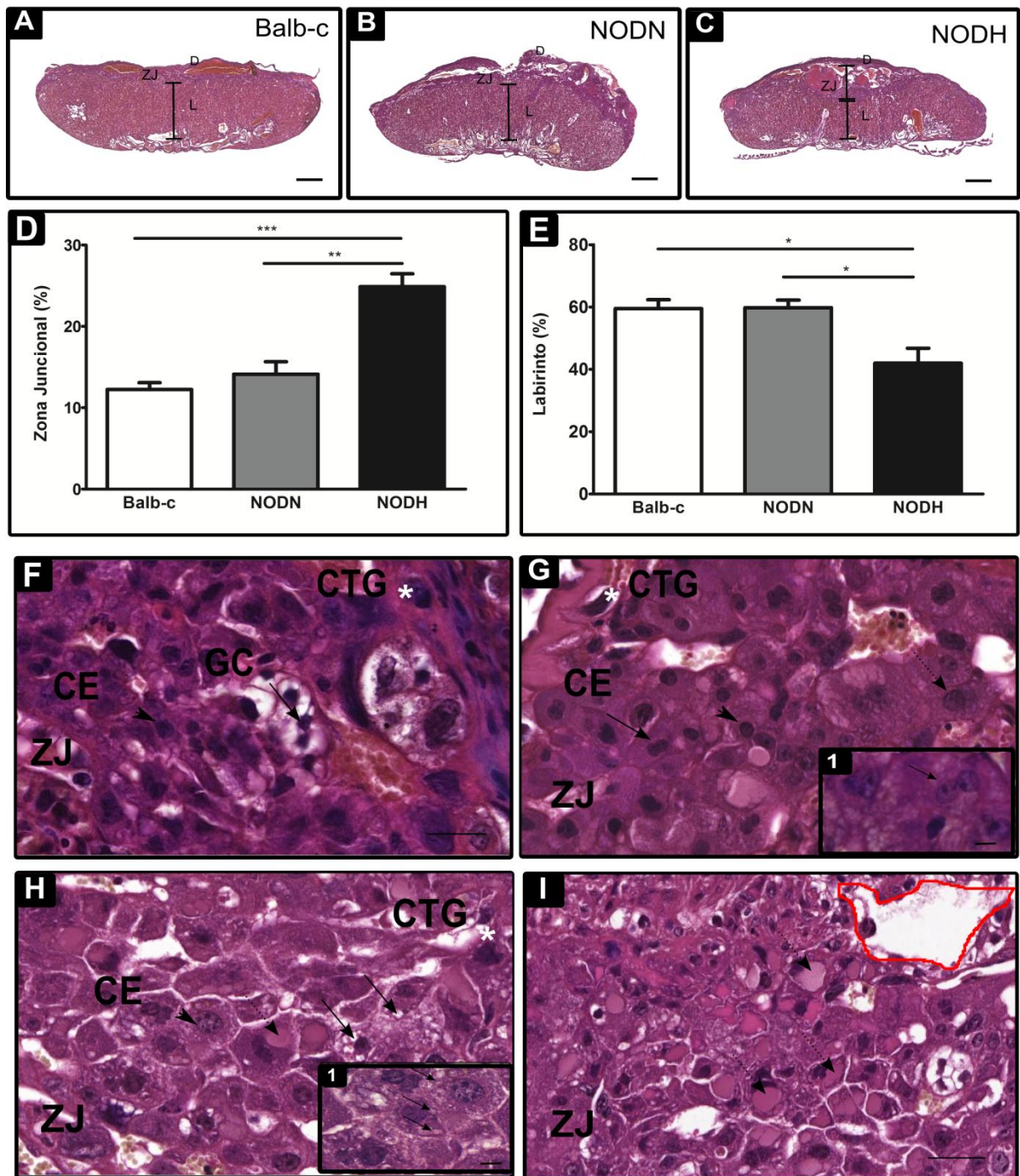


Figura 7 - Fotomicrografia das placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação dos grupos Balb-c (A), NODN (B) e NODH (C) com delimitações da decídua (D), zona juncional (ZJ) e labirinto (L). **D-E**) Gráficos de barras com as médias da espessura da ZJ e L. **F**) Fotomicrografia do grupo Balb-c com ênfase na ZJ com células trofoblásticas gigantes (CTGs) (*), células espongiotrofoblásticas (CEs) (cabeça de seta) e células glicogênicas (CGs) (seta). **G**) Fotomicrografia do grupo NODN, ênfase nos detalhes celulares das CEs monucleadas (cabeça de seta) e binucleadas (seta), **1-** detalhes celulares das CEs, com pouca vacuolização citoplasmática (seta). **H**) Fotomicrografia do grupo NODH com ênfase na ZJ, (CTGs) (*) e CEs com mais vacúolos (seta) e com gotículas esinofílicas citoplasmáticas, **1-** detalhes celulares das CEs, com maior vacuolização citoplasmática (seta). **I**) Fotomicrografia do grupo NODH, com degeneração cística de CGs (traçado vermelho) e predominância de CEs com depósito citoplasmático (seta pontilhada). Cortes

de Parafina, HE. Barras: 100µm/50µm. Dados expressos como média ± E.P.M.; ANOVA, pós teste de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$; $n=3$.

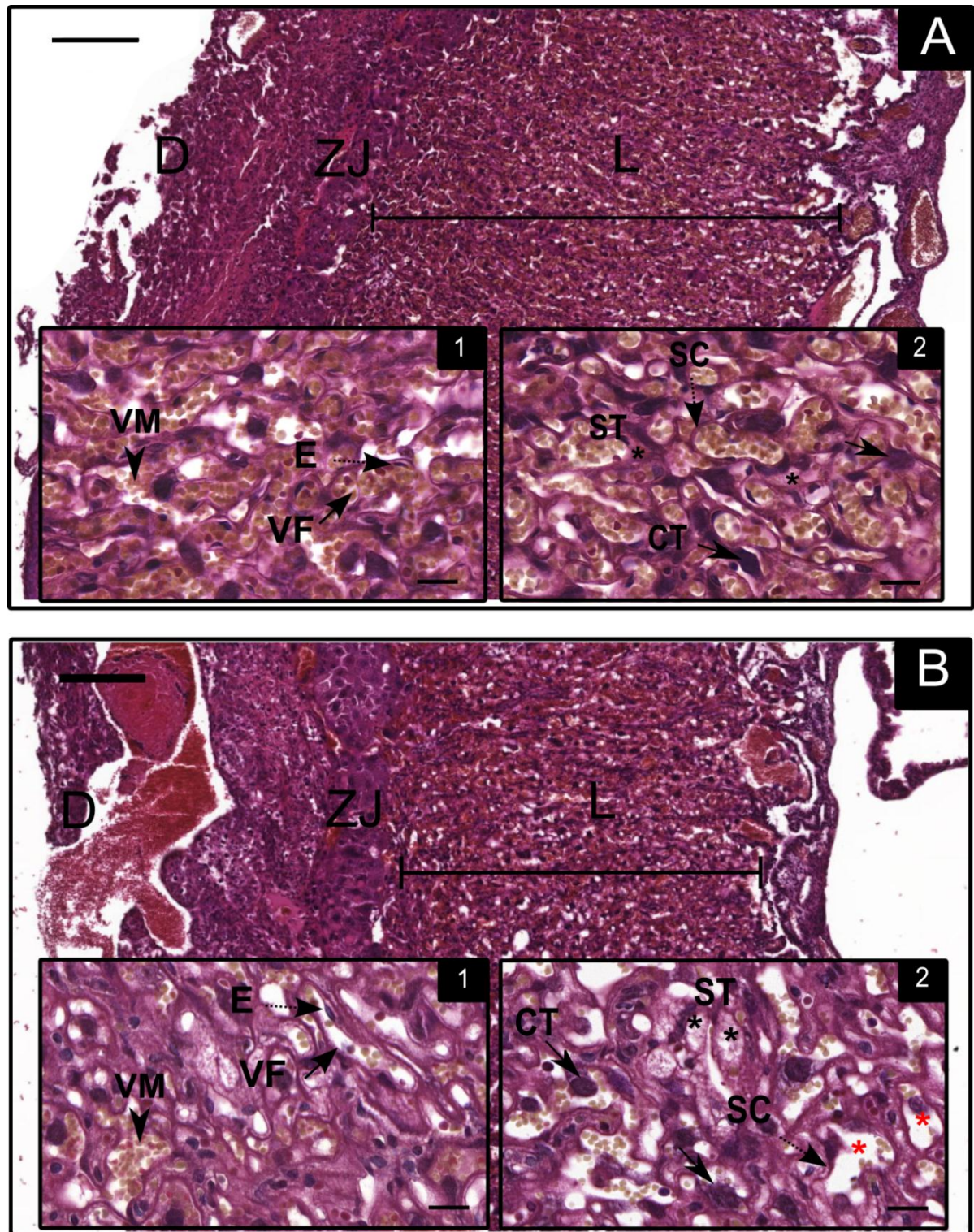


Figura 8 - Fotomicrografia de placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação. **A)** Fotomicrografia do grupo Balb-c da decidua (D), zona juncional (ZJ) e labirinto (L), **1-** detalhe do labirinto, com vaso materno (VM) (cabeça de seta) e vaso fetal (VF) (seta) e endotélio (E) (seta pontilhada), **2-** detalhe do citotrofoblasto (CT) (seta), sinciotrofoblasto (SC) (seta pontilhada), e septos trofoblásticos (ST) (*). **B)** Fotomicrografia do grupo NODH com evidente redução da ZJ, **1-** detalhe do VM, VF e E com padrão de distribuição mais

retilíneo, 2- detalhe do CT apresentando basofilia citoplasmática mais forte, ST com espessamento, SC com vacuolização citoplasmática e VM e VF mais dilatados (* vermelho). Cortes de Parafina, HE. Barras: 50µm.

As lâminas coradas com PAS mostraram reação positiva em todos os grupos, no entanto o padrão de marcação e localização foi diferente entre os grupos. No grupo Balb-c a marcação foi mais intensa na zona juncional e labirinto com predominância nas CGs (**Figura 9A-B**), enquanto no grupo NODN e NODH a coloração foi predominante nas CEs nas duas regiões, e no grupo NODH observou-se marcação mais intensa comparada ao grupo NODN (**Figura 9C-D-E-F**).

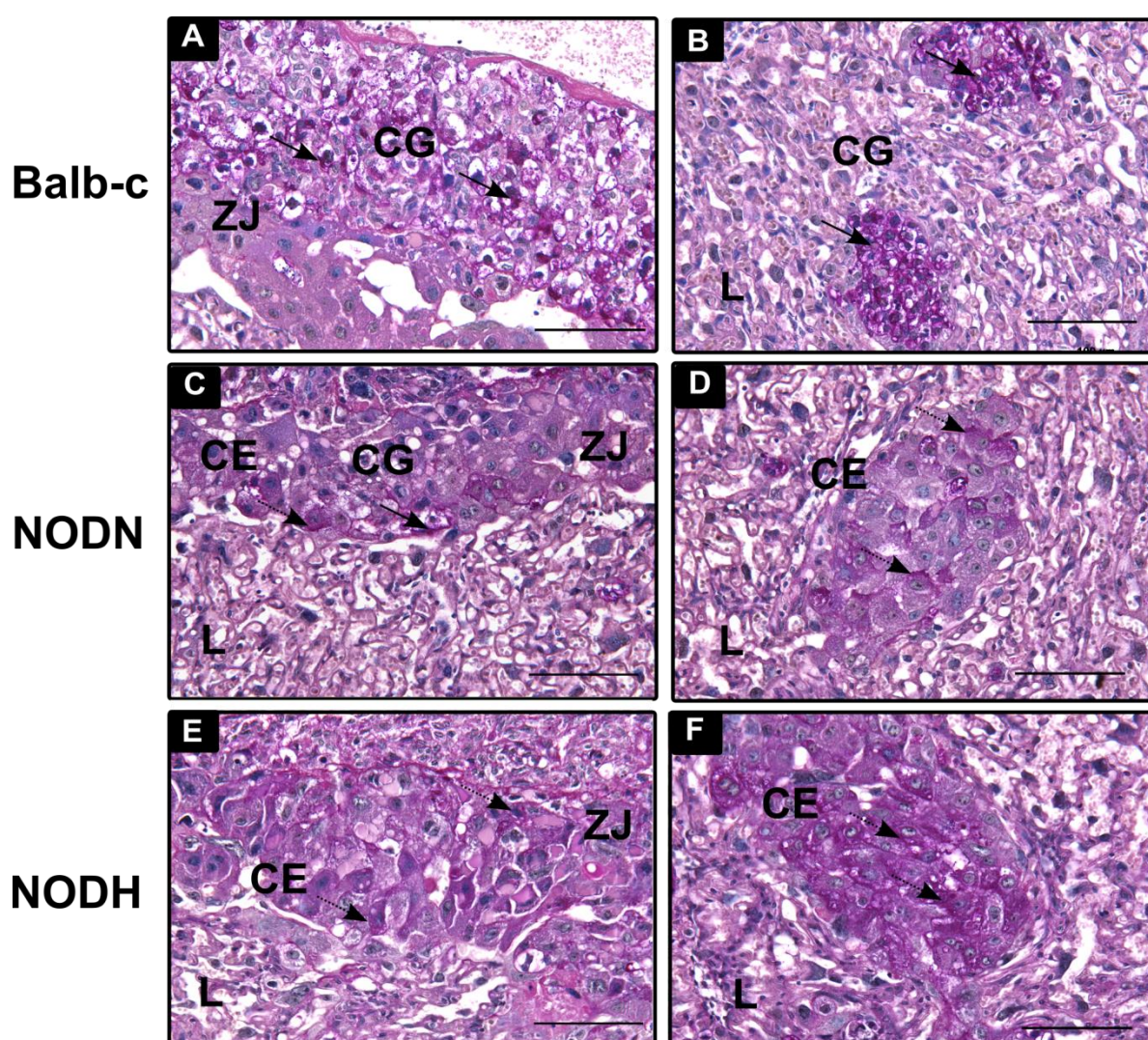


Figura 9 - Fotomicrografia de placentas de camundongos no dia 19,5 de gestação dos grupos Balb-c (A, B), NODN (C, D) e NODH (E, F). **A)** Zona juncional (ZJ) com coloração de PAS positiva no citoplasma das células glicogênicas (CGs) (seta) e espaço extracelular (seta pontilhada). **B)** Aglomerados de CGs (seta) no labirinto (L) coradas com PAS. **C)** coloração de PAS positiva no citoplasma das células espongiotrofoblásticas (CEs) (seta) e espaço extracelular (seta pontilhada). **D)** aglomerados de CEs no labirinto (L) coradas com PAS. **E)** Coloração PAS positiva nas CEs (setas) e no espaço

extracelular (seta pontilhada). **F)** aglomerado de CEs coradas com PAS no labirinto. Cortes de Parafina, PAS. Barras: 100 μ m.

5.5 Avaliação imunohistoquímica

Na reação imunohistoquímica de CD105 foi observada imunolocalização na zona juncional (ZJ) e labirinto (L) nos grupos Balb-c (**Figura 10A-11A**), NODN (**Figura 10B-11B**) e NODH (**Figura 10C-11C**). No grupo Balb-c, observaram-se as células espongiofoblásticas (CEs) e células glicogênicas (CGs) da ZJ expressando essa proteína no citoplasma (**Figura 10A**) com marcação mais fraca nos grupos NODN e NODH (**Figura 10B-C**). No entanto, na análise quantitativa não houve diferença significativa quanto à intensidade da marcação entre os grupos (**Figura 10D**). No labirinto houve marcação no citotrofoblasto (CT) e sinciciotrofoblasto (SC) (**Figura 11A-B-C**), com diferença estatística entre os grupos. No grupo Balb-c observou-se maior marcação em relação ao NODN ($847 \pm 65,4$; $500 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$) e ao NODH ($206 \pm 62,7 \mu\text{m}^2$, $p < 0,0001$). O grupo NODH a expressão foi menor que o NODN ($p < 0,05$) (**Figura 11D**).

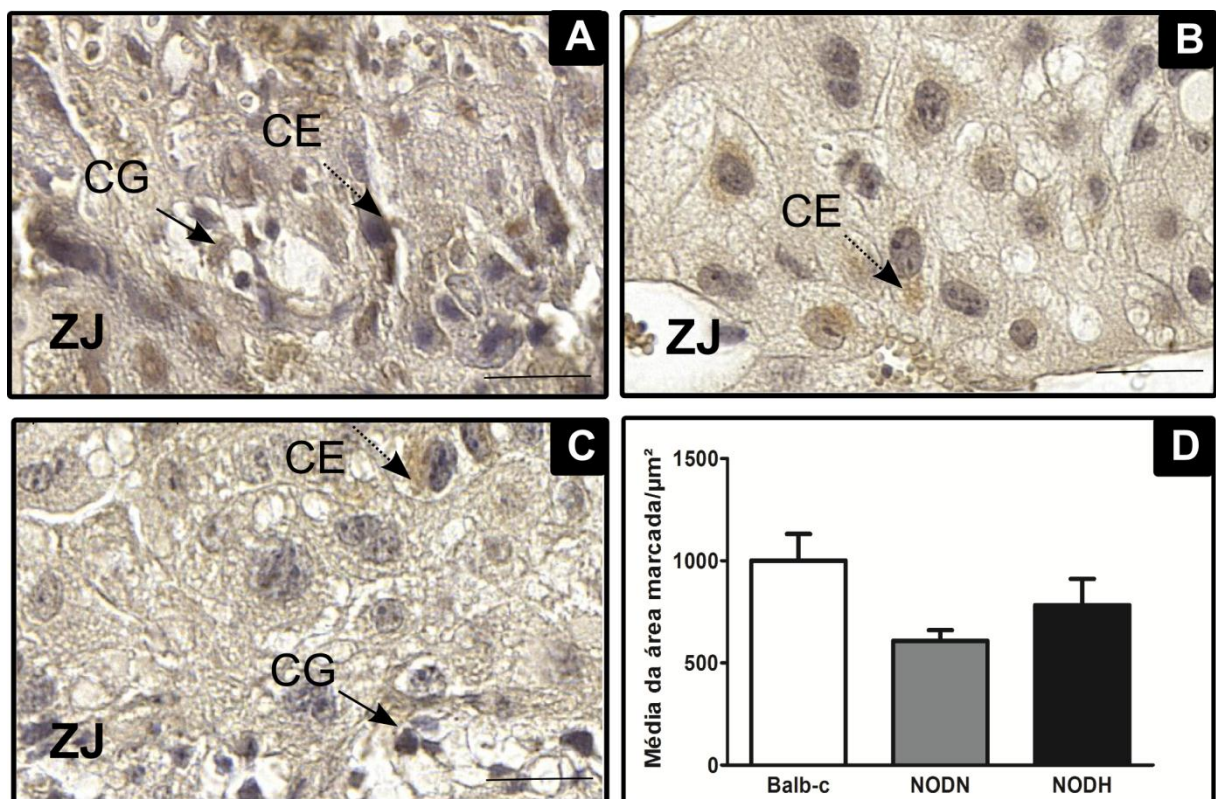


Figura 10 - Imunolocalização de CD105 na zona juncional (ZJ) de placentas dos grupos Balb-c (**A**), NODN (**B**) e NODH (**C**) no 19,5 dg. Notar que a marcação (coloração marrom) predomina nas células espongiofoblásticas (CEs) (seta) e células glicogênicas (CGs) (seta pontilhada). Cortes de Parafina. Barras: 50 μ m. **D)** Quantificação da imunomarcação de CD105 na ZJ. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; teste-*t*; $n=3$.

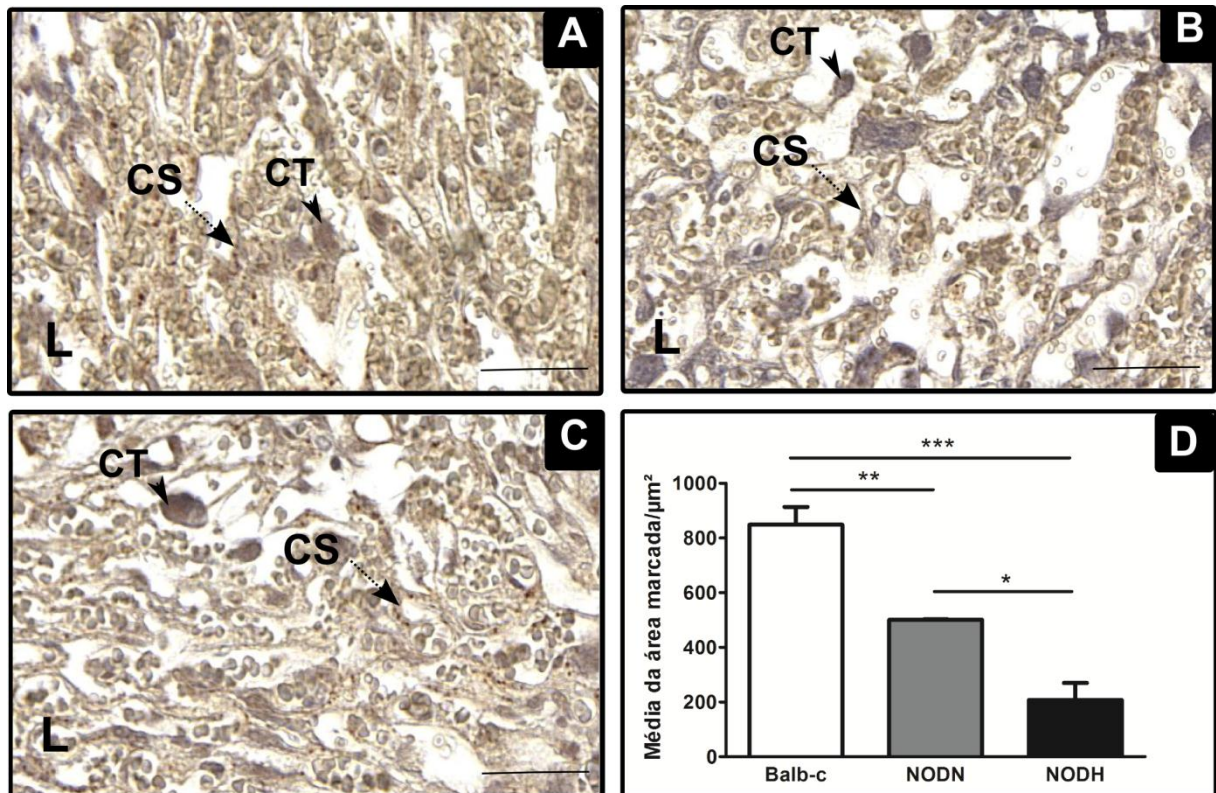


Figura 11 - Imunolocalização de CD105 no labirinto (L) de placentas dos grupos Balb-c (A), NODN (B) e NODH (C) no 19,5 dg. Marcação presente no citotrofoblasto (CT) (cabeça de seta) e sinciotrofoblasto (SC) (seta). Cortes de Parafina. Barras: 50μm. D) Quantificação da imunomarcação de CD105 no L. Dados expressos como média ± E.P.M.; teste-t; *p < 0,05; **p < 0,001 e ***p < 0,0001; n=3.

Com relação à expressão proteica de Caspase-3 na ZJ, observou-se marcação no citoplasma das CGs em todos os grupos (**Figura 12A-B-C**). Quantificando a intensidade da marcação na ZJ observou-se diminuição na expressão de Caspase-3 no grupo NODH ($663 \pm 107 \mu\text{m}^2$) em relação ao NODN ($1239 \pm 55,4 \mu\text{m}^2$) $p < 0,001$ e ao Balb-c ($1848 \pm 74,3 \mu\text{m}^2$) $p < 0,0001$ (**Figura 12D**). No L observou-se marcação no citotrofoblasto e sinciotrofoblasto em todos os grupos (**Figura 13A-B-C**). Na quantificação não houve diferença significativa entre os grupos (**Figura 13D**).

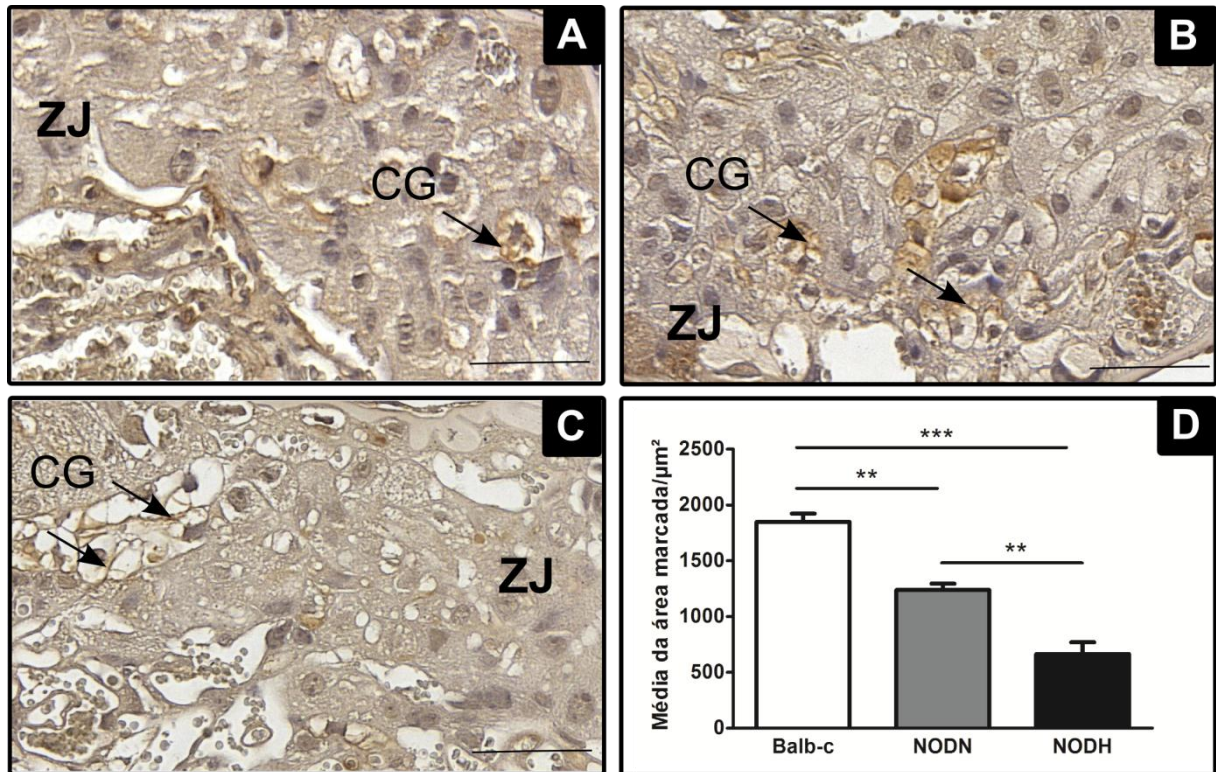


Figura 12 - Imunolocalização de Caspase-3 na zona juncional (ZJ) de placentas de Balb-c (A), NODN (B) e NODH (C) no 19,5 dg. Notar a marcação (coloração marrom) nas CGs (seta). Cortes de Parafina. Barras: 50 μm . D) Quantificação da imunomarcação na ZJ. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$; $n=3$.

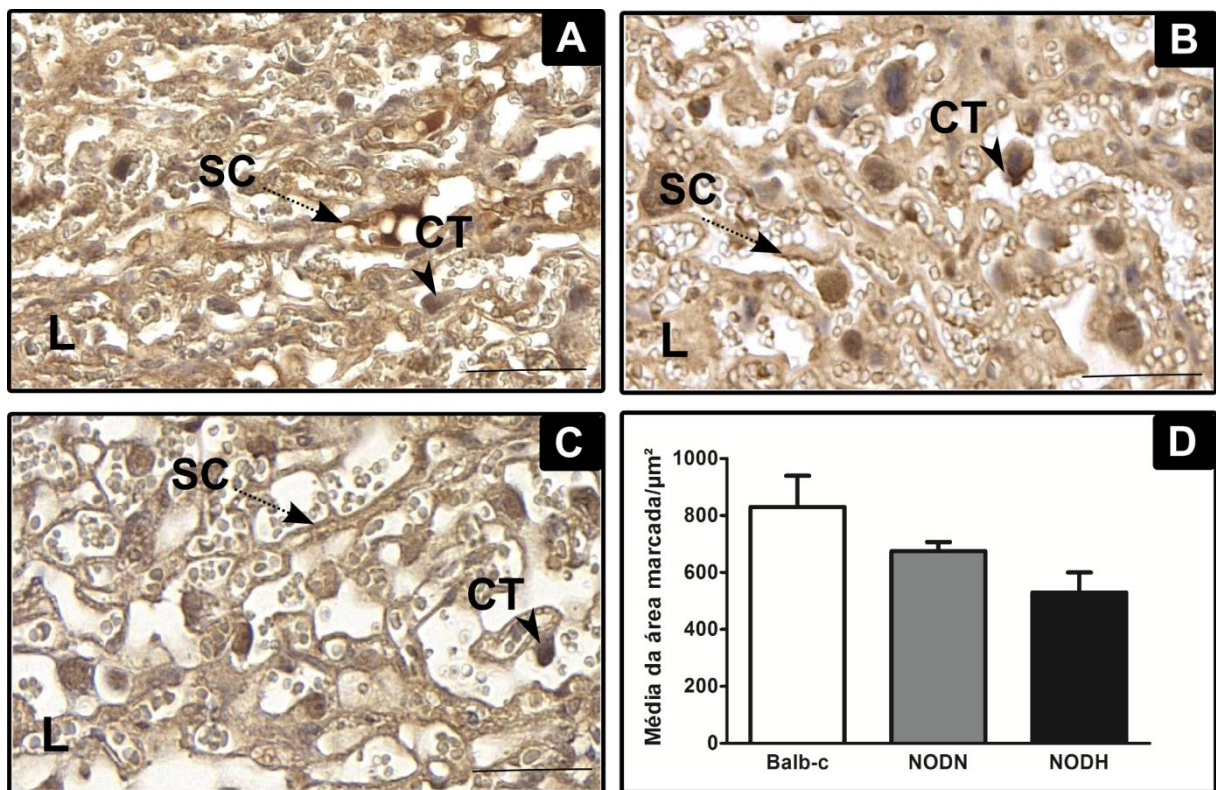


Figura 13 – Imunolocalização de Caspase-3 no labirinto (L) de placentas de Balb-c (A), NODN (B) e NODH (C) no 19,5 dg. Marcação presente no CT (cabeça de seta) e

sinciciotrofoblasto (SC) (seta pontilhada). Cortes de Parafina. Barras: 50 μ m. **D)** Quantificação da imunomarcação de Caspase-3 no L. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; teste-*t*; n=3.

A marcação para Histona-3 estava presente na ZJ e L em todos os grupos. Na ZJ o padrão de marcação foi semelhante entre os grupos, marcando citoplasma nas CEs e núcleo e citoplasma das CGs (**Figura 14A-B-C**). Após a quantificação da marcação na ZJ foi observado aumento da expressão desse marcador no grupo NODH (259,7 $\pm$ 16,6 μ m²) em relação aos grupos Balb-c (154,8 $\pm$ 30 μ m²) e NODN (154,8 $\pm$ 16,6 μ m²) $p < 0,05$ (**Figura 14D**). No labirinto houve marcação no CT e SC em todos os grupos (**Figura 15A-B-C**). A expressão foi maior no grupo Balb-c (653 $\pm$ 96 μ m²) em relação aos grupos NODH (261,5 $\pm$ 14,5 μ m²) $p < 0,001$ e NODN (322 $\pm$ 15,7 μ m²) $p < 0,05$ (**Figura 15D**).

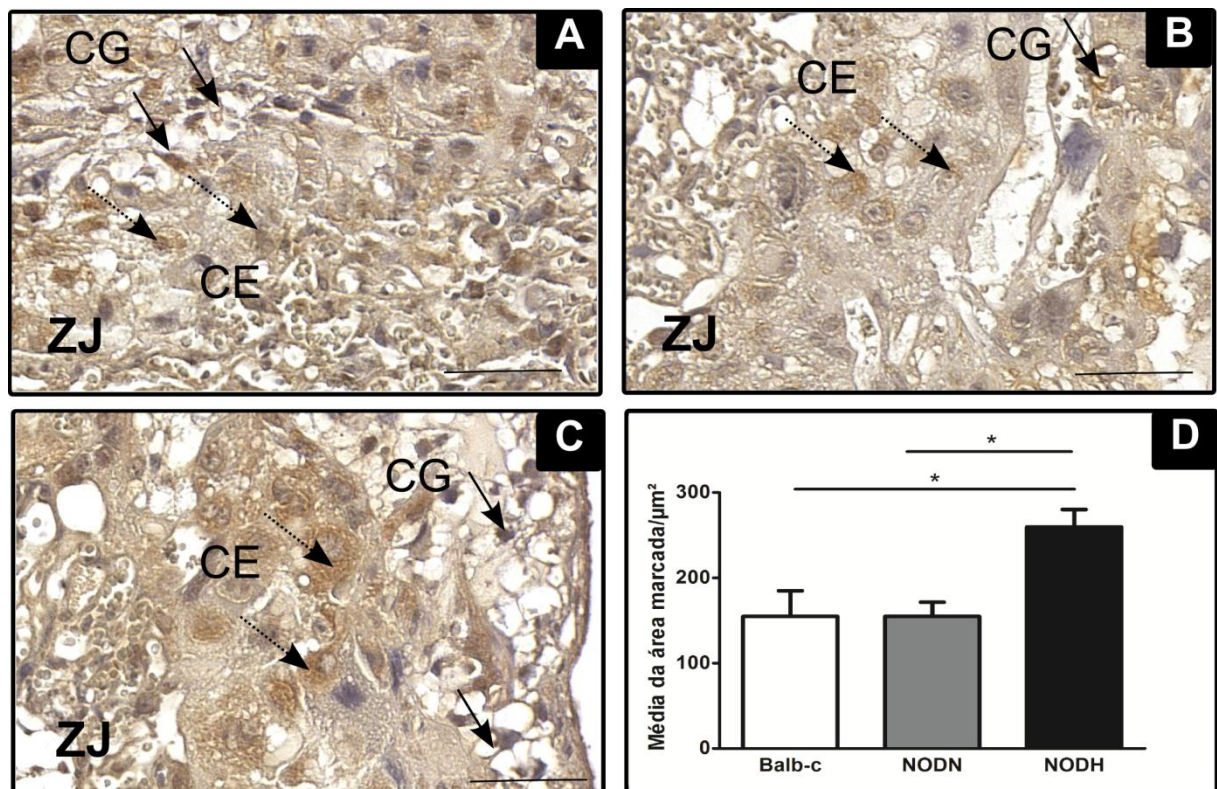


Figura 14 - Imunolocalização de Histona-3 na zona juncional (ZJ) de placentas de Balb-c (**A**), NODN (**B**) e NODH (**C**) no 19,5 dg. Notar que a marcação (coloração marrom) predomina nas CGs (seta) e CEs (seta pontilhada). Cortes de Parafina. Barras: 50 μ m. **D)** Quantificação da imunomarcação de Histona-3 na ZJ. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; teste-*t*; * $p < 0,05$; n=3.

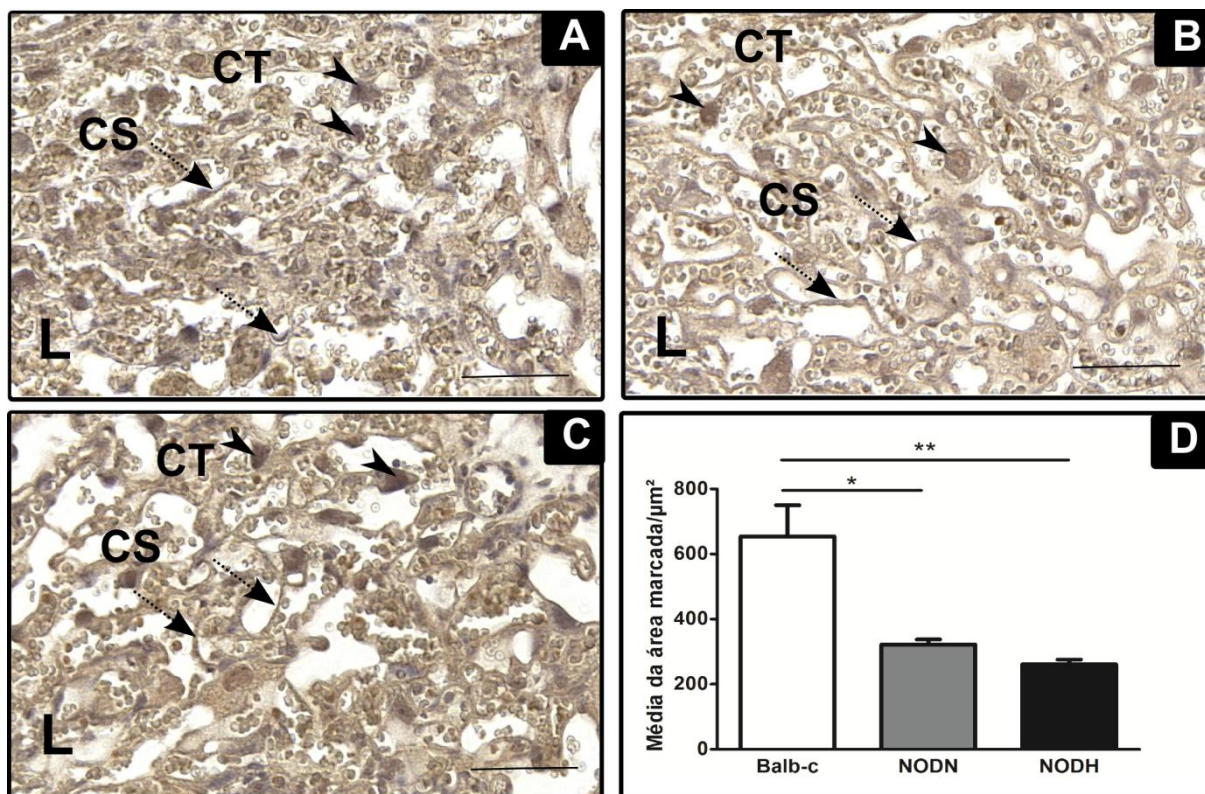


Figura 15 – Imunolocalização de Histona-3 no labirinto (L) de placentas de Balb-c (**A**), NODN (**B**) e NODH (**C**). Marcação presente no CT (cabeça de seta), e SC em todos os grupos (seta pontilhada). Cortes de Parafina. Barras: 50μm. **D**) Quantificação da imunomarcacão de Histona-3 no L. Dados expressos como média ± E.P.M.; teste-t; *p < 0,05 e ** p < 0,001; n=3.

5.6 Avaliação imunoenzimática

Houve aumento na concentração de CD105 no grupo NODH no soro ($5,28 \pm 0,36$ pg/ml, p < 0,05) com relação ao grupo NODN ($3,02 \pm 0,47$ pg/ml, p < 0,05) (**Figura 16**). Na placenta o grupo NODH a concentração de CD105 foi maior ($69,72 \pm 0,48$ pg/ml, p < 0,001) em relação ao grupo NODN ($56,48 \pm 4,5$, pg/ml, p < 0,05) e Balb-c ($50,29 \pm 2,4$ pg/ml, p < 0,001) (**Figura 17**). A concentração PIGF-2 aumentou em NODH ($2,92 \pm 0,07$, pg/ml, p < 0,001) em comparação com o grupo Balb-c ($1,86 \pm 0,11$ pg/ml, p < 0,001) e NODN ($2,45 \pm 0,16$ pg/ml, p < 0,05) (**Figura 17**), no soro não houve diferença entre os grupos. As concentrações de VEGF-A no soro e na placenta foram semelhantes entre os grupos.

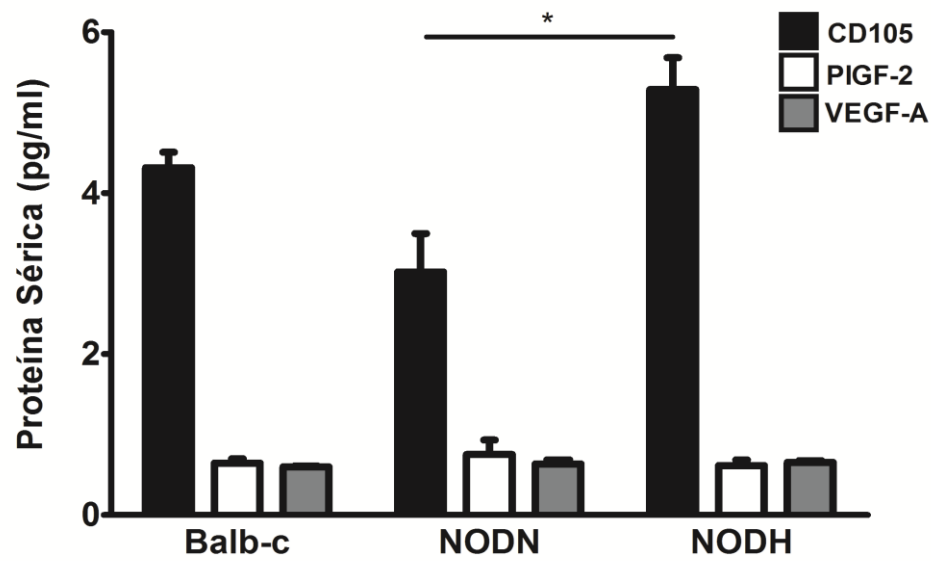


Figura 16 – Concentração das proteínas CD105, PIGF-2 e VEGF-A no soro de Balb-c, NODN e NODH no 19,5 dg. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; ANOVA, pós teste de Tukey; * $p < 0,05$; $n=3$.

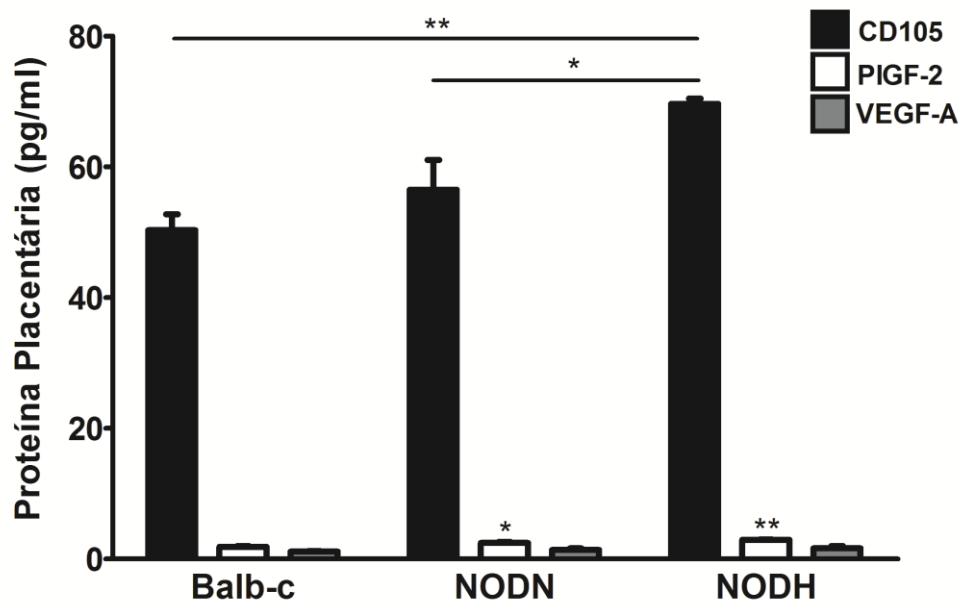


Figura 17 – Concentração das proteínas CD105, PIGF-2 e VEGF-A nas placentas de Balb-c, NODN e NODH no 19,5 dg. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M.; ANOVA, pós teste de Tukey; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$; $n=3$.

6 DISCUSSÃO

Durante a gestação o desenvolvimento do tecido placentário é de fundamental importância na manutenção do feto e sua integridade depende do equilíbrio dos eventos de proliferação, diferenciação e morte celular (RUDGE et al., 2012). Da mesma maneira, o fluxo sanguíneo na placenta precisa ser adequado para garantir um fornecimento de nutrientes e substratos ao feto, contribuindo para o seu crescimento e desenvolvimento (FURUKAWA et al., 2014). Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar as alterações placentárias em camundongos na condição de diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

Neste estudo foram utilizadas fêmeas prenhas de camundongos diabéticos não obesos (NOD), distribuídas em um grupo normoglicêmico e outro hiperglicêmico e fêmeas prenhas Balb-c. As fêmeas diabéticas foram diagnosticadas com 120 dias, com a ocorrência de hiperglicemia severa (≥ 500 mg/dl) e esse estado hiperglicêmico permaneceu durante todo o período gestacional. Além das alterações de glicose no sangue, as fêmeas apresentaram queda no estado geral de saúde, como perda da massa muscular, poliúria e distensão abdominal, um quadro de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) evidente, com características semelhantes ao modelo preconizado por Pavin e Zollner (1994).

A hiperglicemia durante a gestação tem sido associada a alterações no peso do feto e da placenta (VAMBERGUE; FAJARDY, 2011; YU et al., 2008). Nossos resultados sobre o peso fetal comprovam que a hiperglicemia comprometeu o desenvolvimento fetal, reduzindo significativamente o peso. Por outro lado, o peso placentário foi maior no grupo NODH. Esses resultados foram concordantes com os encontrados por Burke et al. (2007), em camundongos NOD hiperglicêmicos (glicemia ≥ 270 mg/dl) e foram semelhantes a modelos de diabetes induzida por estreptozotocina em ratas em relação aos pesos fetais e placentários (glicemia ≥ 400 mg/dl, Gewolb et al., 1983; ≥ 200 mg/dl, Acar et al., 2008) ou por aloxana em relação ao peso placentário (glicemia ≥ 200 mg/dl, Zorn et al., 2011) ou peso fetal (glicemia ≥ 300 mg/dl, Farias et al., 2014). A gestação em ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina ou aloxana é caracterizada por aumento do peso e/ou tamanho placentário em graus variáveis de restrição do crescimento fetal (CIRKEL et al.,

1986; ROBINSON et al., 1988) dependendo da severidade do diabetes (AERTS, 1990).

Em camundongos diabéticos, induzidos com estreptozotocina, ocorre redução do peso fetal e fenótipo placentário comparável àquele observado em ratas, apesar de ser menos severo (glicemia $\geq 300\text{mg/dl}$). Isso parece estar relacionado a diferenças na invasão trofoblástica e remodelação vascular durante a formação da placenta (YU et al., 2008).

O peso e tamanho aumentados da placenta, conhecido como placentomegalia, tem sido associados com as alterações na histologia da placenta diabética (ZORN, et al., 2011). Em nosso modelo de diabetes, foi possível observar aumento de espessura da zona juncional e a presença de condensação e retração nuclear nas células trofoblásticas gigantes (CTGs) e células espongiotrofoblásticas (CEs), além de maior vacuolização citoplasmática. Em placentas de ratos, o tamanho dessa região está relacionado com o aumento de células glicogênicas (CGs) e aumento da atividade proliferativa das células trofoblásticas, provavelmente para compensar a baixa eficiência placentária (GÜL et al., 2015; SOARES et al., 2012).

Adicionalmente, muitas CEs apresentavam gotículas eosinofílicas citoplasmáticas e as células glicogênicas (CGs) apresentavam áreas com degeneração cística. O acúmulo de vacúolos intracitoplasmáticos nas células trofoblásticas são características de células com hiperplasia decorrentes de alterações no transporte celular, que comprometem as atividades endócrinas, metabólicas e nutricionais da placenta (WAKISAKA et al, 2008). A degeneração cística das CGs é um processo natural no final da gestação quando ocorre a regressão dessas células, no entanto, também pode explicar o menor peso dos fetos no grupo NODH, pois essa alteração morfológica contribui para o espessamento dessa região limitando o aporte de sangue para o labirinto (FURUKAWA et al., 2014; YU et al., 2008).

Através da reação de histoquímica com ácido periódico de Schiff (PAS), verificou-se que as CGs e CEs foram mais positivas ao PAS. O acúmulo de glicogênio nas CEs presente no grupo NOD foi diferente em relação ao grupo Balb-c, sendo que no grupo diabético foi predominante. O aumento do depósito de

glicogênio é uma característica da placenta diabética, e provavelmente se deve aos elevados níveis de glicose na circulação materna (GÜL et al., 2015). A função biológica das CGs ainda é pouco compreendida, mas parece se relacionar com o metabolismo de glicogênio, funcionando como um importante depósito de energia acessível à célula (FURUKAWA et al., 2014). No entanto, o acúmulo de glicogênio na zona juncional, pode interromper a difusão do sangue materno até o labirinto e prejudicar o fornecimento de nutrientes ao feto (GÜL et al., 2015).

Uma das principais funções da zona juncional é atuar como compartimento glandular endócrino da placenta armazenando e produzindo hormônios e fatores de crescimento essenciais para a gestação (GÜL et al., 2015), as alterações morfológicas observadas nessa região podem ser decorrentes de distúrbios metabólicos provocados pela hiperglicemia materna (VAMBERGUE; FAJARDY, 2011; YU et al., 2008).

As nossas observações no labirinto indicaram redução da espessura do labirinto, modificação na organização e disposição dos vasos sanguíneos e vacuolização e espessamento dos septos trofoblásticos no grupo NODH. No labirinto, as camadas de sinciotrofoblasto e as células individualizadas do citotrofoblasto formam a principal área de comunicação materno-fetal (SOARES et al., 2012). Alterações morfológicas e moleculares nessas células e modificação na organização dos vasos sanguíneos maternos e fetais podem reduzir a área de contato entre o sangue materno e os septos trofoblásticos, e consequentemente prejudicar a área de trocas na barreira placentária (FURUKAWA et al., 2011). A redução da perfusão sanguínea na interface materna-fetal causa hipóxia fetal o que contribui para a restrição do crescimento do feto (GÜL et al., 2015).

A formação de novos vasos a partir de preexistentes (angiogênese) é um mecanismo fundamental para garantir um fluxo de sangue adequado para a placenta, e com isso, fornecer os substratos que dão suporte ao crescimento e desenvolvimento fetal (PIETRO, et al., 2010). O fator 2 de crescimento da placenta (PlGF-2), o Fator A de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF-A) e o CD105 são mediadores importantes na angiogênese (ANDRAWEEERA et al., 2012; GREGORY et al. 2014). O CD105, é uma glicoproteína acessória que atua como co-receptor para o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), via de sinalização

responsável pela regulação de processos celulares, como diferenciação, migração e proliferação das células, que levam a formação de vasos sanguíneos (GREGORY et al., 2014).

Durante a gestação em camundongos, foi observada alta expressão de CD105 nas células endoteliais dos vasos sanguíneos maternos na zona vascular da decídua basal e nos vasos fetais do labirinto no 12º dg (KRUSE; HALLMANN, BUTCHER, 1999). Os dados do presente estudo mostraram baixa expressão de CD105 no labirinto no grupo NODH com relação aos grupos que não sofriam de distúrbios hiperglicêmicos. Essas evidências sugerem a participação de CD105 na intensa angiogênese e remodelação vascular que ocorre no labirinto durante a gestação. Da mesma forma, a baixa expressão de CD105 pode estar relacionada às alterações na organização e disposição dos vasos sanguíneos observadas nos animais do grupo NODH. A concentração dessa proteína na sua forma solúvel foi alta no soro e na placenta total, sendo diferente na análise da expressão *in situ* onde foi observado redução de CD105.

O CD105 é uma glicoproteína transmembranar predominantemente expressa em células endoteliais em proliferação. É um co-receptor para o TGF- β 1 e TGF- β 3 (CHEIFETZ et al., 1992). Propõe-se que em gestação com pré-eclâmpsia essa proteína na circulação sanguínea, possuem efeitos anti-angiogênico, pois inibe a sinalização de TGF- β e resulta em disfunção endotelial (VENKATESHA et al., 2006). No entanto, a ação parácrina desta proteína na placenta e função é desconhecida em pré-eclâmpsia (GREGORY et al., 2014). Da mesma forma, a sua ação sobre a proliferação endotelial e vasodilatação será provavelmente, dependente da disponibilidade do ligante e deve ser investigada na disfunção da placenta durante o diabetes.

Nossos resultados mostraram aumento da concentração PIGF-2 na placenta do grupo NODH, enquanto que as concentrações séricas e placentárias de VEGF não foram diferentes entre os grupos. Na verdade, a expressão elevada de PIGF em ratos (células do estroma e células trofoblásticas) no final da gravidez, e sua ação estimulante na proliferação das células trofoblásticas extravilosas no primeiro trimestre em humanos, sugerem que o PIGF pode contribuir para uma placentação bem sucedida regulando a apoptose durante a gestação normal (ATHANASSIADES;

LAKA, 1998; CHOI et al., 2005). Os fatores angiogênicos circulantes podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da pré-eclâmpsia (MUNDIM et al., 2015). O aumento na circulação sFlt-1 sequestra o VEGF e PlGF livres impedindo que os mesmos cheguem ao seu receptor, ocasionando à disfunção do endotélio (MASUYAMA et al., 2007). Na população em geral, aumento dos níveis séricos de sFlt-1 e baixos níveis de VEGF e PlGF sugerem desequilíbrio entre os fatores pro e anti-angiogênicos e prever pré-eclâmpsia antes do desenvolvimento da doença (CELIK et al., 2013). No estudo envolvendo gestantes diabéticas, também foi observado aumento de sFlt-1 e redução de PlGF, essas alterações aumentavam a probabilidade dessas mulheres de desenvolverem pré-eclâmpsia (POWERS et al., 2010). A expressão do VEGF na placenta de rato no final da gestação desempenha um papel importante no crescimento e na função fisiológica do sistema vascular (CHOI et al., 2005).

O desenvolvimento placentário depende do equilíbrio entre os eventos de proliferação e diferenciação das células trofoblásticas (SOARES et al., 2012, FARIAS et al., 2014). Em ratas, o diabetes aumenta a proliferação celular de células espongiotrofoblásticas e células trofoblásticas gigantes da zona juncional e labirinto no 17º dg, o que pode explicar a placentomegalia observada no 20º dg (ZORN et al., 2011).

Verificamos aumento na marcação para Histona-3 na zona juncional indicando intensa proliferação celular nessa região. Os nossos resultados são concordantes com os encontrados por Acar et al. (2008) que evidenciaram um aumento de marcação positiva para PCNA e Ki67 em placentas de animais diabéticos a partir do 17º dg. No labirinto, a expressão de H3 foi menor no grupo NODH em relação aos outros grupos, sugerindo menor sensibilidade das células dessa região ao estímulo hiperglicêmico em relação às células da zona juncional como já relatado por outros autores (GIACHINI et al., 2008; YU et al., 2008).

Adicionalmente, uma menor expressão de p57 (inibidor do ciclo celular) em placentas de ratas diabéticas no final da gestação (ACAR; KORGUN; USTUNEL, 2012) pode contribuir para o aumento da atividade proliferativa na condição de hiperglicemia. Em humanos, resultados semelhantes já foram relatados com a redução da expressão de p27 e p57 e aumento da expressão de ciclina D3, PCNA e Ki67 nas vilosidades placentárias de mulheres diabéticas (UNEK et al., 2014). Esses

dados sugerem que os inibidores do ciclo celular sofrem alterações durante estados de hiperglicemia o que pode resultar em divisão celular descontrolada.

Além de proliferação e diferenciação celulares, a eliminação de células inviáveis por morte celular programada é necessária para um adequado desenvolvimento placentário (SMITH et al., 1997; STRASZEWSKI-CHAVEZ et al., 2005). Observamos, na zona juncional, algumas células trofoblásticas gigantes com condensação da cromatina e células espongiotrofoblásticas com retração citoplasmática nas placentas do grupo NODH.

Este aspecto microscópico é característico de células com perda de viabilidade e em morte (MEIER et al., 2000). No entanto, verificamos baixa expressão de Caspase-3 (proteína efetora de apoptose) na zona juncional no grupo NODH em relação aos grupos Balb-c e NODN, enquanto que no labirinto a expressão não foi diferente entre os grupos.

Esses achados são diferentes dos encontrados por Bobadilla et al. (2010) e Gül et al. (2015) que relataram alta expressão de Caspase-3 nas placentas de ratas e camundongos diabéticos, sem distinguir entre as regiões do labirinto e zona juncional. Essas discrepâncias nos resultados podem estar relacionadas à metodologia de quantificação da marcação imunohistoquímica e à avaliação conjunta da placenta, sem considerar as diferenças de expressões entre as regiões da zona juncional e labirinto.

Utilizando método de TÚNEL, Rudge et al. (2012) encontraram redução do número de células em apoptose nas placentas de 18 e 21 dias de gestação em ratas diabéticas. Da mesma forma, em placentas humanas também já foi verificado redução do índice apoptótico em placentas de pacientes com diabetes mellitus gestacional (DMG) (MAGEE et al., 2014; BELKACEMI et al., 2013) e DM1. Interessantemente, Belkacemi et al. (2013) também verificaram redução do número de células marcadas para Caspase-3 em placentas de mulheres com DMG. O aumento do peso placentário em pacientes com DMG tem sido associado com alterações de vias de apoptose e inflamação (MAGEE et al., 2014).

O aumento da marcação para Histona 3 e a diminuição da marcação para Caspase 3 nas células da zona juncional reforçam os achados histológicos de

aumento de espessura nessa região nas placentas dos animais do grupo NODH o que contribuiu para o aumento do peso placentário semelhante ao encontrado em pacientes com DMG (BELKACEMI, et al., 2013; MAGEE, et al., 2014) e DM1 (NELSON, et al., 2009).

Em conjunto com as alterações celulares observadas na placenta, a modificação da expressão dos fatores angiogênicos, pode estar relacionada com a disfunção placentária observada no grupo NODH o que consequentemente prejudica o desenvolvimento fetal nesse modelo de diabetes.

7 CONCLUSÕES

Os camundongos diabéticos não obesos (NOD) do grupo hiperglicêmico (NODH) apresentaram hiperglicemia severa a partir de 120 dias de idade e desenvolveram um quadro de diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Podemos concluir que a hiperglicemia comprometeu o desenvolvimento placentário e fetal. Além disso, provocou desequilíbrio nos reguladores do ciclo celular e nos fatores angiogênicos o que alterou a estrutura e funcionalidade da placenta. Desta forma, podemos afirmar que esse modelo animal é útil para compreender os impactos do DM1 na saúde materna e fetal.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **J Exp Zool**, v. 66, p. 603-628, 1993.

ACAR, N. et al. Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? **Acta Histochem**, v. 110, p. 408-417, 2008.

ACAR, N.; KORGUN, E. T.; USTUNEL, I. Cell cycle inhibitor p57 expression in normal and diabetic rat placentas during some stages of pregnancy. **Histol Histopathol**, v. 27, p. 59-68, 2012.

AERTS, L.; HOLEMANS, K.; VAN ASSCHE, F. A. **Impaired insulin response and action in offspring of severely diabetes rats**. In: Shafir E, editor. Frontiers in Diabetes Research. Lessons from Animal Diabetes III. London: Slmith Godon, p. 561-566, 1990.

AHMED, A. et al. Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PIGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen- A Review. **Placenta**, v. 21, p. 16-24, 2000.

AIRES, M. B.; SANTOS, A. C. V. Effects of maternal diabetes on trophoblast cells. **World J Diabetes**, v. 6, p. 338-344, 2015.

ALBAGHDADI, A. J.; KAN, F. W. Endometrial Receptivity Defects and Impaired Implantation in Diabetic NOD Mice1. **Biol Reprod**, v. 87, p. 1–16, 2012.

ALONSO, N. et al. Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPiV/CD26 Is Associated with Changes in CD8+T Effector Memory Subset. **Plos One**, p.1-22, 2015.

ALVAREZ-MUÑOZ, P. et al. Cellular Basis of Diabetic Nephropathy: V. Endoglin Expression Levels and Diabetic Nephropathy Risk in Patients with Type 1Diabetes. **J Diabetes Complications**, v. 24, p. 242-249, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, p. 62-69, 2015.

AOKI, C. A. et al. NOD mice and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 4, p. 373–379, 2005.

ATHANASSIADES, A.; LALA, PK. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. **Placenta**, v.19, p. 465-473, 1998.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, p. 69-82, 2014.

- ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? **Nat Med**, v. 5, p. 601-604, 1999.
- BALDA, C. A.; PACHEGO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes tipo 1. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, p. 175-80, 1999.
- BARRIETOS, G. et al. The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal–maternal interface. **J Reprod Immunol**, v. 83, p. 85-94. 2009.
- BARSKI, A. et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell**, v. 129, p. 823-837. 2007.
- BELKACEMI, L. et al. Reduced apoptosis in term placentas from gestational diabetic pregnancies. **J Dev Orig Health Dis**, v. 4, p. 256-265, 2013.
- BJÖRK, O.; PERSSON, B. Villous structure in different parts of the cotyledon in placentas of insulin-dependent diabetic women. A morphometric study. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 63, p. 37-43, 1984.
- BOBADILLA, R. A. et al. Placental effects of systemic tumour necrosis factor- α in an animal model of gestational diabetes mellitus. **Placenta**, v. 31, p. 1057-1063, 2010.
- BURKE, S. D. et al. Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. **Diabetes**, v. 56, p. 2919-2926, 2007.
- BUSCHARD, K. et al. Treatment with sulfatide or its precursor, galactosylceramide, prevents diabetes in NOD mice. **Autoimmunity**, v. 34, p. 9-17, 2001.
- CARMELIET, P. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, p. 435-439, 1996.
- CELIK, H.; AVCI, B.; IŞIK, Y. Vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in normal pregnant women and pregnant women with pre-eclampsia. **J Obstet Gynaecol**, v. 33, p. 355-358, 2013.
- CHEIFETZ, S. et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 267, p. 19027-19030, 1992.
- CHOI, W. S. et al. Expression of placenta growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy. **J Vet Sci**, v. 6 p. 179-83, 2005.
- CIRKEL, U. et al. Effects of alloxan-induced diabetes mellitus on the metabolism of the rat placenta. **Arch Gynecol**, v. 237, p. 155-163, 1986.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). **Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais**. Brasília, DF, p. 25, 2013.
- CROSS, J. C.; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, p. 1508-1518, 1994.

CVITIC, S.; DESOYE, G.; HIDEN, U. Glucose, insulin, and oxygen interplay in placental hypervascularisation in diabetes mellitus. **Biomed Res Int**, p. 1-12, 2014.

DELOVITCH, T. L.; SINGH, B. The Nonobese Diabetic Mouse as a Model of Autoimmune Diabetes: Immune Dysregulation Gets the NOD. **Immunity**, v. 7, p. 727-738, 1997.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS (DATASUS) Disponível em: www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=1139862. Acessado em 13/03/2016.

DUFF, S. E.; LI, C.; GARLAND, J. M.; KUMAR, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB J**, v. 17, p. 984-992, 2003.

FARIAS, P. S. et al. Maternal diabetes effects rat placental morphology and pregnancy. **Endocrine**, v. 45, p. 497-501, 2014.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FORSBACH-SÁNCHEZ, G.; TAMEZ-PERÉZ, H. E.; VAZQUEZ-LARA, J. Diabetes and Pregnancy. **Arch Med Rev**, v. 36, p. 291-92, 2005.

FURUKAWA, S. et al. Effect of chlorpromazine on rat placenta development. **Exp Toxicol Pathol**, v. 66, p. 41-47, 2014.

FURUKAWA, S. et al. Toxicological Pathology in the Rat Placenta. **J Toxicol Pathol**, v. 24, p. 95-111, 2011.

GEWOLB, I. H.; BARRETT, C.; WARSHAW, J. B. Placental growth and glycogen metabolism in streptozotocin diabetic rats. **Pediatr Res**, v. 17, p. 587-591, 1983.

GEWOLB, I. H.; MERDIAN, W.; WARSHAW, J. B.; ENDERS, A. C. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. **Diabetes**, v. 35, 1254-1261, 1986.

GIACHINI, F. R. C. et al. Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. **J Anat**, v. 212, p. 31-41, 2008.

GOLBERT, A.; CAMPOS, M. M. A. Diabetes melito tipo 1 e gestação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 307-314, 2008.

GREGORY, A. L.; XU, G.; SOTOV, V.; LETARTE, M. Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. **Placenta**, v. 28, p. 93-99, 2014.

GÜL, M. et al. Histopathological, ultrastructural and apoptotic changes in diabetic rat placenta. **Balkan Med J**, v. 32, p. 296-302, 2015.

HOLMES, V. A. The role of angiogenic and antiangiogenic factors in the second trimester in the prediction of preeclampsia in pregnant women with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, p. 3671-3677, 2013.

HOMO-DELARCHE, F. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? **Braz J Med Biol Rev**, v. 34, p. 437-447, 2001.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas**. 6th edition, p. 1-160, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas**. 7th edition, p. 1-144, 2015.

JAKEMAN, L.B. et al. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 848-859, 1993.

KIRSTEN, V. R.; PATRÍCIA SESTERHEIM, P.; DAVID SAITOVITCH, D. Modelos e Modelos experimentais par experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina**, v. 43, p. 3-10, 2010.

KRUSE, A.; HALLMANN, R.; BUTCHER, E.C. Specialized patterns of vascular differentiation antigens in the pregnant mouse uterus and the placenta. **Biol Reprod**, v. 61, p.1393-1401, 1999.

LEITER, E. H.; VON HERRATH, M. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. **Diabetologia**, v. 47, p. 1657-1660, 2004.

MACINTOSH, M. C. M. et al. Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. **BMJ**, v. 333, p. 177-182, 2006.

MAGEE, T. R. et al. Gestational diabetes mellitus alters apoptotic and inflammatory gene expression of trophoblasts from human term placenta. **J Diabetes Complications**, v. 28, p. 448-459, 2014.

MARUICHI, M. D.; AMADEI, G.; ABEL, M. N. C. Diabetes Mellitus Gestacional. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med**, v. 57, p. 124-128, 2012.

MASUYAMA H. et al. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, p. 2672-2679, 2007.

MEDELA, A. M. B. et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. **BMC Medic**, v. 8, p. 1-12, 2010.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MUNDIM, G. J. et al. Assessment of angiogenesis modulators in pregnant women with pre-eclampsia: a case-control study, v. 293, p. 369-375, 2016.

NASSIRI, F. et al. Endoglin (CD105): A Review of its Role in Angiogenesis and Tumor Diagnosis, Progression and Therapy. **Anticancer Res**, v. 31, p. 2283-2290, 2011.

NEGRATO, C. A. et al. Dysglycemias in pregnancy: from diagnosis to treatment. Brazilian consensus statement. **Diabetol Metab Syndr**, v. 2, p. 1-14, 2010.

NELSON, S. M. et al. Placental Structure in Type 1 Diabetes Relation to Fetal Insulin, Leptin, and IGF-I. **Diabetes**, v. 58, p. 2634-2641, 2009.

PADMANABHAN, R.; SHAFIULLAH, M. Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. **Arch Physiol Biochem**, v. 109, 260-271, 2001.

PAVIN, E. J.; ZOLLNER, R. L. Implantação da linhagem “NOD-MICE” (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 38, p.105-108, 1994.

PERLINGEIRO, R.C. Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. **Development**, v. 134, p. 3041-3048, 2007.

PIETRO, L. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. **Placenta**, v. 31, p. 770-780, 2010.

POWERS, R. W. et al. Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. **Plos One**, v. 5, p. 13263, 2010.

REYNOLDS, L. P.; KILLILEA, S. D.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive system. **FASEB J**, v. 6, p. 886-892, 1992.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-4, 1997.

ROBINSON, J. et al. Maternal diabetes in rats. Effects on placental growth and protein turnover. **Diabetes**, v. 37, p. 1665-1670, 1988.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: Lessons from mouse mutants. **Nature**, p. 538-548, 2001.

RUDGE, M. V. C. et al. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in placentas of rats with severe diabetes. **Braz Arch Biol Technol**, v. 55, p. 243-250, 2012.

SASMITO, S. D. et al. Endoglin expression and the level of $\text{tgf-}\beta$ are increased in the placental tissue and correlated with low fetal weight in malaria infected mice. **The J Tropical Life Sci**, v. 5, p. 01-07, 2015.

SEAWARD A. V. C.; BURKE S. D.; CROY B. A. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. **Human Reprod**, v. 25, p. 2829-2839, 2010.

SINGER, D.B. et al. Placentas in pregnancies complicated by maternal diabetes. **Surv Synth Pathol Res**, v. 3, p. 333-341, 1984.

SMITH, S. C.; BAKER, P. N.; SYMONDS, E. M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 177, p. 57-65, 1997.

SOARES, M. J. et al. Rat placentation: An experimental model for investigating the hemochorial maternal-fetal interface. **Placenta**, v. 33, p. 233-243, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes para o tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus**, 2015.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMMS, V. M.; MOR, G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. **Endocr Rev**, v. 26, p. 877-897, 2005.

SUN, J. et al. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal developmente in animal models. **Int J Mol Sci**, v. 14, p. 9319-9337, 2013.

UNEK, G. et al. Immunohistochemical distribution off cell cycle proteins p27, p57, cyclin D3, PCNA and Ki67 in normal and diabetic human placentas. **J Mol Histol**, v. 45, p. 21-34, 2014.

VAMBERGUE, A.; FAJARDY, I. Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight. **World J Diabetes**, v. 2, p. 196-203, 2011.

VENKATESHA, S. et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med**, v. 12, p. 642-649, 2006.

WAKISAKA, N. et al. Ultrastructure of placental hyperplasia in mice: comparison of placental phenotypes with three different etiologies. **Placenta**, v. 29, p. 753-759, 2008.

YU, U. et al. Influence of murine maternal diabetes on placental morphology, gene expression, and function. **Arch Physiol Biochem**, v. 114, p. 99-110, 2008.

ZORN T. M. T. et al. Maternal diabetes affects cell proliferation in developing rat placenta. **Histol Histopathol**, v. 26, p. 1049-1056, 2011.

ZYGMUNT, M. et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obst Gyn Reprod Biol**, v. 110, p. 10-18, 2003.

ANEXOS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

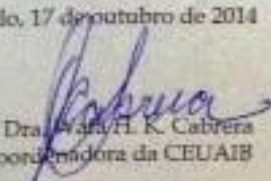
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análise funcional e gênica de células-tronco embrionárias oriundas do broto hepático de camundongos NOD", protocolo nº 1239/14, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Marlúcia Bastos Aires – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 15/10/2014.

This is to certify that the proposal "Functional and genetic analysis of hepatic stem cells from liver bud of diabetic NOD mice embryos", protocol nº 1239/14, under the responsibility of Durvanei Augusto Maria and Marlúcia Bastos Aires – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 10/15/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto	Nº de animais/espécie
10/2014 - 06/2015 Laboratório de Bioquímica e Biotécnicas	30 Camundongos diabéticos não obesos 20g (F), 8 Camundongos diabéticos não obesos 20g (M), 50 Camundongos diabéticos não obesos 5g - 11 dias (Indiferente), 50 Camundongos diabéticos não obesos 5g - 12 dias (Indiferente), 50 Camundongos diabéticos não obesos 15g - 16 dias (Indiferente) — Proctores da Biotéc da Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 17 de outubro de 2014


Dra. Maria H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Reproduction

Manuscript ID REP-16-0109

Title DIABETES CONSEQUENCES IN THE NON-OBESE DIABETIC (NOD) MICE
PLACENTA AND PREGNANCY

Authors Santos, Anne Caroline
Silva, Ana Letícia
Santos, Márcio Roberto
Alencar, Aline
Bevilacqua, Estela
Daher, Silvia
Maria, Durvanei
Aires, Marlúcia

Date Submitted 01-Mar-2016

