

**Ministério da Educação  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG**

**BRUNO ZAVAN**

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS APÓS  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS DURANTE A GESTAÇÃO DE  
CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG

2011

BRUNO ZAVAN

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS APÓS  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS DURANTE A GESTAÇÃO DE  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Alfenas/MG

2011

Zavan, Bruno.

Aspectos morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por LPS durante a gestação de camundongos / Bruno Zavan. - 2011.

106 f. -

Orientador: Valdemar Antonio Paffaro Junior  
Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.  
Bibliografia.

1. Sepsis. 2. Útero. 3. Células Natural Killer. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio. II. Título.

CDD: 573.6

BRUNO ZAVAN

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS APÓS  
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS DURANTE A GESTAÇÃO DE  
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Prof.**

**Instituição:**

**Assinatura:**

**Prof.**

**Instituição:**

**Assinatura:**

**Prof.**

**Instituição:**

**Assinatura:**

***Dedico aos meus pais, Sérgio e Sandra, por todo apoio, confiança e carinho; e aos meus irmãos, Cinthia e Vinícius, pelo afeto e companheirismo.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por caminhar ao meu lado e me propiciar ensinamentos até mesmo nas dificuldades.

Aos meus pais, Sérgio e Sandra, que despertaram em mim o amor pela ciência. Agradeço por estarem sempre presentes, apoiando nas horas difíceis e celebrando as conquistas.

Aos meus irmãos, Cinthia e Vinícius, exemplos de determinação e amor pela profissão.

À Ana Laura Berti Munhoz, pelo amor, pela companhia, pelos conselhos e por fazer tudo valer a pena.

Aos colegas de laboratório, Érika Pasqua Tavares, Kamila Leite Rodrigues, Anna Claudia Guimarães Freire e Daniel Antero de Almeida Galdino, e aos demais colegas do programa, Paula Comune Pennacchi, Cláudia de Souza Ferreira, Luciana Costa Teodoro, Maria Ângela Rodrigues, Michael Brian Santiago, Fabiana Cardoso Vilela e Ana Laura de Oliveira Carvalho, pela troca de conhecimento e pelas experiências nas disciplinas que cursamos juntos.

À Universidade Federal de Alfenas por dar todo o suporte necessário para a minha formação acadêmica.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela iniciativa inovadora no método de promover o desenvolvimento intelectual e formação de profissionais aptos para desempenhar atividades de pesquisa e magistério superior.

Ao Coordenador Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva pela dedicação na implementação do curso e pelo incentivo ao desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior, pela orientação neste trabalho, mas acima de tudo pela amizade, por alimentar o interesse em busca do conhecimento científico e pelos ensinamentos de outros valores, até mesmo mais importantes, que lapidaram minha formação como pessoa.

À professora Dra. Andréa M. do Amarante Paffaro pela contribuição intelectual nesse trabalho.

Aos professores, técnicos e funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) por todo auxílio e pela ótima convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado e Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

Aos professores: Luiz Alberto Beijo (UNIFAL-MG), Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão (UNIFAL-MG), Alexandre Giusti-Paiva (UNIFAL-MG), Roseli Soncini (UNIFAL-MG), Valdemar Antonio Paffaro Junior (UNIFAL-MG), Andrea M. do Amarante Paffaro (UNIFAL-MG), Angel Roberto Barchuk (UNIFAL-MG), Carla Roberta de Oliveira Carvalho (USP-SP), Patrícia Rieken Macedo Rocco (UFRJ), Jorge Luiz Pesquero (UFMG), Mercia de Paula Lima (UFMG), Luiz Guilherme S. Branco (USP-RP) Mogens L. Glass (USP-RP), Marília Franco Ariosa (UNIFAL-MG) e Marcos José Marques (UNIFAL-MG), por compartilharem comigo suas experiências e conhecimentos.

E à todos aqueles que, a pesar de não terem sido mencionados individualmente, contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

Em muitos mamíferos, é notado um influxo de linfócitos no início da gestação, que é acompanhado por um processo de proliferação, diferenciação e migração destas células. Em camundongos estes linfócitos se distribuírem na região mesometrial de cada sítio de implantação (SIE). Estudos imunocitoquímicos indicaram que estes linfócitos são células *Natural Killer*, porém, sua morfologia e comportamento peculiar sugerem que elas representam uma subpopulação de NK específica do útero durante a gestação, sendo portanto denominadas células *Natural Killer* uterinas (uNK). A função conhecida para estas células em camundongos é a liberação de citocinas como IFN- $\gamma$  que leva à dilatação das artérias espiraladas decíduais e manutenção da integridade decidual, contribuindo, portanto, para o desenvolvimento normal da decídua e da placenta. A infecção intra-uterina foi reconhecida como a causa primária de partos prematuros e corrobora para o desenvolvimento de leucomalácia periventricular e displasia broncopulmonar. Estudo recente em camundongos prenhes demonstrou que a injeção intra-uterina de LPS de *E.coli* provoca aumento da expressão de Fosfodiesterase 4B (PDE4B) e da atividade fosfodiesterase na interface materno-fetal, aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 no líquido amniótico o que induz o parto prematuro e a diminuição da viabilidade fetal. É esperado que a administração de LPS promova o aumento sistêmico e central de citocinas pró-inflamatórias, e que o animal responda com alterações endócrinas, imunológicas e comportamentais com o fito de favorecer o restabelecimento da homeostasia. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos comportamentais da administração de LPS em camundongos, bem como os efeitos no útero prenhe e nas células *uNK* desses animais por meio do estudo morfológico, citoquímico e estereológico. O estabelecimento do comportamento febril foi identificado a partir da segunda hora após a administração de LPS, e esse evento ocorreu concomitante ao estabelecimento do comportamento análogo à ansiedade. Foi possível identificar nos animais tratados o comportamento de apatia e redução na capacidade exploratória, que somados ao comportamento depressivo, estabelecido após 1 hora da aplicação do LPS, fazem parte das alterações que constituem o comportamento doentio. O

tratamento provocou também alterações no ambiente uterino, de tal forma que foi possível identificar um significativo aumento de células *uNK* imaturas na região do miométrio dos SIE. Além disso, o tratamento levou à diminuição da quantidade de células *uNK* maduras e senescentes nas três regiões estudadas dos SIE concomitante ao aumento de células *uNK* que possuíam padrão alterado na expressão de N-actilgalactosamina nos seus grânulos e superfície. O período onde foram encontradas tais alterações acompanhou o período onde houve perda na marcação de perforina, sugerindo a ocorrência de degranulação. A imunocitoquímica demonstrou que o tratamento com LPS parece ter induzido a despolimerização dos filamentos contrateis de  $\alpha$ -actina causando relaxamento nos vasos que irrigam o ambiente uterino.

Palavras-chave: Sepses. Útero prenhe. Morfofisiologia.

## ABSTRACT

In mammalian, there is a lymphocyte influx in early pregnancy, which is accompanied by proliferation, differentiation and migration of these cells. These lymphocytes distribute in mesometrial region of each embryo implantation site (EIS). Immunocytochemical studies indicated that these cells are Natural Killer cells, but their peculiar morphology and behavior suggest that they represent a uterus specific NK subpopulation during pregnancy called uterine Natural Killer cells (*uNK*). The known function for these cells in mice is cytokines releasing such as IFN- $\gamma$  leading to decidual spiral arteries dilation and maintaining decidual integrity, contributing to normal development of decidua and placenta. Intrauterine infection was recognized as primary cause of preterm labor and supports the periventricular leukomalacia and bronchopulmonary dysplasia development. Recent study in pregnant mice showed that *E.coli* LPS intra-uterine injection causes increased expression of Phosphodiesterase 4B (PDE4B) and fosfodiesterase activity in maternal-fetal interface, increased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 concentrations in amniotic fluid which leads to premature delivery and reduced fetal viability. It is expected that LPS administration promotes systemic and central pro-inflammatory cytokines increasing, and that the animal responds with endocrine, immune and behavioral disorders with the aim of promoting homeostasis restoration. In this context, the present study evaluated the behavioral effects of LPS administration in mice and the effects on pregnant uterus and uNK cells of these animals through morphological, cytochemical and stereological study. The feverish behavior establishment was identified from second hour after LPS administration, and this event was concomitant with anxiety-like behavior establishment. It was possible to identify treated animals apathy behavior, reduction in exploratory capacity and depressive behavior drawn 1 hour after LPS application as part of sickness behavior. The treatment also caused changes in the intrauterine environment, so that we could identify a significant increase of immature uNK cells in myometrium region of EIS. Furthermore, the treatment decreased the amount of mature and senescent uNK cells in the three EIS studied regions, concomitantly with the increasing granules and surface N-acetyl-galactosamine expression altered uNK cells. These changes were accompanied by the

perforin labeling loss and a reduction on blood vessel  $\alpha$ -actin labeling, suggesting respectively the uNK cell cytotoxicity (perforin releasing) and actin contractile filament despolymerization causing relaxation of blood vessels that supplies the decidua and embryo.

Keywords: Sepsis. Pregnant uterus. Morphophysiology.

*...Porque sou do tamanho daquilo  
que vejo, e não do tamanho da  
minha altura.*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Labirinto em Cruz Elevado utilizado para os testes comportamentais referentes aos parâmetros de ansiedade.....	40
Figura 2 – Aparato utilizado para os testes comportamentais referente aos parâmetros de memória de reconhecimento de objeto.....	42
Figura 3 – Aparato utilizado para o teste comportamental do Nado Forçado, para avaliação dos parâmetros relacionados à depressão.....	43
Figura 4 – Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10 <sup>o</sup> ddg e áreas utilizadas para quantificação dos subtipos de células <i>uNK</i> .....	48
Figura 5 – Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos normais no 10 <sup>o</sup> ddg mostrando os subtipos de células <i>uNK</i> .....	60
Figura 6 - Fotomicrografia de corte histológico de sítio de implantação de camundongo tratado com LPS no 10 <sup>o</sup> ddg contendo células <i>uNK</i> alteradas.....	61
Figura 7 - Análise estereológica da Região 1 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados.....	64
Figura 8 – Análise estereológica da Região 2 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados.....	67
Figura 9 – Análise estereológica da Região 3 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados .....	69
Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10 <sup>o</sup> ddg submetidos a dupla marcação de citoquímica de lectina DBA + imunocitoquímica para perforina.....	73
Figura11 – Fotomicrografias de cortes histológicos de SIE no 10 <sup>o</sup> ddg submetidos a imunocitoquímica para $\alpha$ -actina .....	75
Figura 12 – Organograma que sintetiza as hipóteses para os mecanismos envolvidos nas alterações observadas durante a gestação em função do estresse provocado pela administração de LPS em camundongos no décimo dia de gestação.....	81
Gráfico 1 – Médias da temperatura (°C) corporal obtidas em cada grupo experimental.....	49
Gráfico 2 – Médias da taxa de entrada nos braços do Labirinto em Cruz Elevado que os animais de cada grupo experimental apresentaram .....	52

Gráfico 3 – Médias do tempo (segundos) de permanência no braço aberto que os animais de cada grupo experimental apresentaram.....	52
Gráfico 4 – Médias do tempo (segundos) de permanência no braço fechado que os animais de cada grupo experimental apresentaram.....	53
Gráfico 5 – Médias (segundos) obtidas a partir da soma da exploração dos dois objetos (A1 e A2) da etapa de teste apresentada pelos animais de cada grupo experimental.....	55
Gráfico 6 – Médias obtidas através do tempo de exploração (segundos) do objeto A3 e B apresentadas pelos animais de cada grupo experimental.....	56
Gráfico 7 – Taxa de discriminação obtida pelo teste comportamental de memória...	56
Gráfico 8 – Médias do tempo (segundos) em que os animais permaneceram estáticos durante o teste do nado forçado.....	58
Gráfico 9 – Médias do total de células uNK por Área Teste na Região 1 .....	62
Gráfico 10 – Médias do total de células uNK por Área Teste na Região 2 .....	63
Gráfico 11 – Médias do total de células uNK por Área Teste na Região 3 .....	63

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> UTERINAS.....	16
2.2	FUNÇÃO DAS CÉLULAS <i>NATURAL KILLER</i> UTERINAS.....	23
2.3	SEPSE E GESTAÇÃO.....	28
2.4	NEUROIMUNOMODULAÇÃO.....	31
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	Objetivos Gerais.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	Animais.....	38
4.2	Organização do grupo experimental.....	38
4.3	Estudo Comportamental.....	39
4.3.1	<b>Análise de Ansiedade</b> .....	40
4.3.2	<b>Análise de Memória de reconhecimento de objetos</b> .....	41
4.3.3	<b>Análise de Depressão</b> .....	42
4.4	Processamento para Embebição em Parafina.....	44
4.5	Citoquímica com Lectina DBA .....	44
4.6	Dupla marcação para lectina DBA e perforina.....	45
4.7	Imunocitoquímica para $\alpha$ -actina.....	46
4.8	Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica.....	47
4.9	Análise Estatística.....	48
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
	<b>APÊNDICE</b> .....	105
	<b>ANEXO</b> .....	106

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação existe a marcante presença de células e mediadores imunológicos na interface materno-fetal e, ao mesmo tempo, o feto em desenvolvimento apresenta metade de seus genes provenientes do pai, o que o caracteriza como um semi-enxerto. O fato de existir elevado número de células imunológicas no ambiente uterino concomitante ao desenvolvimento de um organismo diferente do organismo materno é um paradoxo que foi identificado e assim nomeado primeiramente por Peter Medawar em 1950.

O sucesso da implantação do embrião e seu desenvolvimento parecem estar intimamente relacionados com o balanço de citocinas pró-inflamatórias (Th1 – provenientes de células *T helper 1*) e anti-inflamatórias (Th2 – provenientes de células *T helper 2*) que garantem a tolerância do organismo materno ao feto. Além disso, as células imunológicas maternas interagem com células fetais a fim de criarem um microambiente adequado para o bom andamento da gestação.

As células *Natural Killer* uterinas (*uNK*) são bastante representativas neste ambiente, e estudos sugerem que estas células maternas interagem com células trofoblásticas (fetais) modulando a produção de citocinas e fatores angiogênicos controlando a invasão trofoblástica e o remodelamento tecidual.

A infecção intra-uterina foi reconhecida como a causa primária de partos prematuros. Mesmo sem manifestações clínicas a infecção intra-uterina desencadeia na interface materno-fetal um mecanismo inflamatório que envolve a produção de citocinas, uterotônicos potentes, e metaloproteases, o que resulta em diminuição prematura do comprimento cervical uterino, contração uterina, ruptura das membranas fetais causando o parto prematuro.

A inflamação pode ser induzida em animais experimentais através da exposição à produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, principalmente o lipopolissacarídeo (LPS), mimetizando várias das respostas inflamatórias de fase aguda, sem causar infecção ao hospedeiro.

A sepse durante a gestação é um evento dramático e ainda de alta mortalidade, cuja fisiopatologia permanece em contínua investigação. As alterações fisiológicas da

gestação podem mascarar ou mesmo agravar o quadro clínico da sepse e, portanto, estudos são de fundamental importância para possibilitar o diagnóstico precoce, o qual é elemento crucial para o prognóstico materno e fetal.

Há muito tempo as pesquisas na área da saúde buscam a compreensão dos mecanismos fisiológicos, implicados na regulação dos sistemas imune e nervoso. No entanto, estes estudos, anteriormente desenvolvidos de forma isolada e fragmentada, vêm cedendo espaço para pesquisas integradas, levando em consideração as complexas relações existentes entre os sistemas, que, de fato, veio à tona a percepção de que esses sistemas são partes de uma rede de controle muito mais ampla.

Neste sentido, começa a ficar cada vez mais claro que as alterações de comportamento decorrentes de uma infecção não são conseqüências de uma depressão inespecífica do SNC, mas sim, de um conjunto de adaptações específicas e muito bem organizadas nesse sistema.

A partir disso, o presente trabalho buscou avaliar os efeitos comportamentais da administração de LPS em camundongos, bem como os efeitos no útero prenhe e nas células *uNK* desses animais por meio do estudo morfológico, citoquímico e estereológico, a fim de integrar esses dados buscando explicações sob a ampla visão da neuroimunomodulação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÉLULAS *NATURAL KILLER* UTERINAS

As células *Natural Killer* circulantes (*cNK*) são conhecidamente células com atuação na imunidade inata protegendo o organismo principalmente contra células tumorais, parasitas e células infectadas por vírus ou bactéria (TRINCHIERI, 1989). Esta linhagem celular, que se origina de células progenitoras da medula óssea, representa uma pequena fração dos linfócitos do sangue periférico que possui capacidade citotóxica por apresentar grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzimas (SMYTH, 2005), e são capazes de lisar a célula alvo sem prévia sensibilização (LANIER et al., 1986a; RITZ et al., 1988).

Mais recentemente, foi demonstrado que as células *cNK* também participam no sistema imune adaptativo com características como memória adaptativa, aumentando a resposta frente a uma segunda infecção, inclusive com produção de citocinas semelhante as células T de memória. (SUN et al., 2009).

Em humanos existem dois subtipos de células *Natural Killer* no sangue periférico que se diferem pela expressão da molécula CD56. As células CD56<sup>dim</sup> (que apresentam baixa densidade dessa molécula em sua membrana plasmática) representam 90% das células *NK* periféricas, elas possuem alta densidade de CD16 e têm como função a defesa do organismo pela citotoxicidade. As células CD56<sup>bright</sup>, por sua vez, são CD16<sup>-</sup> e são menos citotóxicas quando comparadas com as CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>, mas apresentam a grande capacidade de produção de citocinas quando ativadas (BAUME et al., 1992; COOPER et al., 2001; PERUSSIA et al., 2005).

As células *Natural Killer* desempenham importantes papéis em tecidos mucosos. Sendo o útero um tecido mucoso que libera grandes quantidades de hormônios, propicia o recrutamento massivo de células imunológicas com o objetivo de apoiar o desenvolvimento do embrião durante a gestação (ZHANG et al., 2010).

Estudos realizados por Koopman e colaboradores (2003) avaliaram pela técnica de *microarray*, se as células *Natural Killer* que aparecem na decídua durante o primeiro

trimestre da gestação eram semelhantes às células CD56<sup>bright</sup> ou CD56<sup>dim</sup>. Os resultados demonstraram que as células *NK* uterinas (ou *NK* deciduais, como o autor se refere) apresentam propriedades únicas e devem ser consideradas como sendo um subtipo independente (ACAR et al., 2011).

Sua origem é hematopoiética, onde a linhagem precursora é a linfocitária (ZENG, 1991; CROY, 1997a). Estudos indicam que a maturação final dos precursores das *cNK* ocorre na periferia, sugerindo a participação do timo (MINGARI et al., 1997; CARLYLE et al., 1998; Di SANTO, 2006), entretanto, ainda existem controvérsias quanto a origem das células *Natural Killer* uterinas (*uNK*).

Alguns pesquisadores sugerem teorias a respeito do aumento dessas células levando em consideração que este fenômeno ocorre na fase secretória do ciclo menstrual e no início da gestação (ACAR et al., 2011). Estudo realizado por Jones e colaboradores (1998) demonstrou que mais de 40% das células *uNK* CD56<sup>+</sup> isoladas do endométrio no período secretório do ciclo menstrual expressavam Ki67, proteína associada ao núcleo que exerce função de ativação essencial para proliferação.

A evidente relação entre quantidade de células *uNK* e o ciclo menstrual sugere a participação dos hormônios estrógeno e progesterona no recrutamento dessas células para o ambiente uterino. Henderson e colaboradores (2003) demonstraram que as células *uNK* expressam receptores- $\beta$  para estrógeno (ER- $\beta$ ).

A quantidade dessas células diminui de maneira proporcional à diminuição da concentração de progesterona, sugerindo que a sobrevivência dessas células ocorra de maneira dependente deste hormônio. Por outro lado, a influência da progesterona parece ocorrer de maneira indireta, uma vez que as células *uNK* não possuem receptores para tal hormônio (KING et al., 1996). A progesterona se liga à receptores de células estromais desencadeando um aumento na secreção de interleucina-15 (IL-15) (OKADA et al., 2000) que, por sua vez, pode estimular a proliferação de células *uNK* sem promover a atividade citotóxica contra células trofoblásticas, fato esse comprovado *in vitro* por Verma e colaboradores (2000) e Kitaya e colaboradores (2003). Outros estudos já demonstraram a importância da IL-15 para a diferenciação das células *NK* (PUZANOV et al., 1996). Para reforçar tal importância, estudos demonstraram que sítios de implantação de camundongos fêmea *Knockout* para IL-15

não possuem células *NK* e, além disso, não apresentam as modificações esperadas nas artérias espiraladas que nutrem o embrião (ASHKAR et al., 2003).

No endométrio, as células endoteliais não expressam a proteína de adesão vascular 1 (VCAM-1) na fase proliferativa do ciclo menstrual, mas durante a fase secretória passa a expressá-la. Portanto, é possível sugerir que as células *uNK* utilizam a integrina do grupo  $\alpha 4\beta 1$  que se liga à proteína VCAM-1 para a adesão endotelial após a ovulação (ACAR et al., 2011).

No útero de camundongos é notado um influxo de linfócitos por volta do 4<sup>o</sup> - 5<sup>o</sup> dia de gestação (ddg), período onde ocorre a implantação do blastocisto. Nesse período esses linfócitos são raros, pequenos, e não apresentam grânulos citoplasmáticos. Estes alcançam os sítios de implantação embrionária pela região vascularizada denominada de região mesometrial que expressa VCAM-1 (KRUSE et al., 2002).

Estas células diferenciam a partir do 6<sup>o</sup> ddg e este fenômeno é notado particularmente em função do acúmulo de grânulos citoplasmáticos nestas células. Estes linfócitos proliferam e diferenciam no útero durante a prenhez, podendo atingir 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro (STEWART; PEEL, 1981) e distribuem-se no miométrio e endométrio da região mesometrial de cada sítio de implantação (STEWART; PEEL, 1981; HEAD, 1996; PAFFARO JR, 2003; BULMER; LASH, 2005) e esta distribuição não está relacionada com a presença de nervos no endométrio uterino (SHEIKHI et al., 2007), mas sim em função de uma matriz extracelular rica em fibronectina, que parece ser utilizada como substrato de migração, favorecendo a proliferação e diferenciação das *uNK* que expressam, concomitantemente fibronectina e seu ligante a integrina  $\alpha 5\beta 1$  (ZAVAN et al., 2010). Segundo esse mesmo autor, a ligação entre a integrina  $\alpha 5\beta 1$  e a fibronectina parece ser um fator importante para a sobrevivência dessas células, uma vez que com diminuição da expressão de fibronectina no final da gestação (devido ao avanço da decidualização e conseqüente diminuição da matriz extracelular) pode ocorrer o desligamento da integrina  $\alpha 5\beta 1$  concomitante à diminuição das células *uNK* no ambiente uterino.

Segundo Chantakru e colaboradores (2001) tais linfócitos contribuem também para a formação de um microdomínio em cada um dos sítios de implantação

denominado agregado linfocitário mesometrial da prenhez (MLAp), que também recebe a denominação de glândula metrial. (STEWART; PEEL, 1981; CROY; KISO, 1993; LOKE; KING, 2000), apesar de não se constituir em uma estrutura glandular (CHANTAKRU et al., 2001).

As células *uNK* são reativas à marcação com ácido periódico de Schiff's (PAS), reagente histológico que marca glicoproteínas, especialmente mucinas, no entanto, a marcação com este reagente apresenta algumas limitações de análise (CROY et al., 2010). Estudos citoquímicos utilizando a lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) que se liga seletivamente a glicoconjugados contendo N-Acetil-D-Galactosamina, demonstraram que a membrana plasmática, bem como, os grânulos das células *NK* uterinas reagem de forma bastante específica com esta lectina. Por meio deste estudo, foi possível caracterizar quatro subtipos correspondentes às formas de diferenciação destas células no útero de camundongos durante a gestação. O *subtipo 1* é composto por células pequenas ( $9 \pm 3 \mu\text{m}$ ) apresentam membrana com forte reatividade à lectina e não apresentam grânulos citoplasmáticos; o *subtipo 2* é representado por células que começam a apresentar alguns grânulos citoplasmáticos e são levemente maiores em diâmetro ( $13 \pm 2 \mu\text{m}$ ); as células do *subtipo 3* apresentam aspecto de célula madura, núcleo com nucléolo evidente e muitos grânulos citoplasmáticos ( $26 \pm 3 \mu\text{m}$ ) e; a forma senescente dessa célula é caracterizada como *subtipo 4* apresentando regiões de extração citoplasmática (vacúolos) com conteúdo granular variável e núcleo com cromatina irregular (PAFFARO Jr et al., 2003).

A utilização da técnica de citoquímica de Lectina DBA para estudos das células *Natural Killer* uterinas foi amplamente adotada, não apenas pela possibilidade da identificação dos diferentes subtipos (estágios de diferenciação) dessas células, mas também por permitir o isolamento de RNA após a coleta das células por técnicas de microdissecção a laser dos cortes histológicos de sítio de implantação embrionária. Além disso, a lectina DBA pode ser associada à esferas magnéticas permitindo o isolamento das células *uNK* a partir de resuspensão de homogenato da porção mesometrial dos sítios de implantação embrionária (CROY et al., 2010b), e posterior a isso, estas células podem ser utilizadas para a separação de células ativadas por

fluorescência, cultura celular de curto prazo ou isolamento de RNA (CROY et al., 2010).

Estudos utilizando camundongos imunodeficientes comprovaram que estes linfócitos pertencem à linhagem *Natural Killer* (*NK*). Estas células estão presentes em camundongos SCID ( $T^-$ ,  $B^-$ ,  $NK^+$ ) e ausentes em  $tg\epsilon 26$  ( $NK T^-$ ) e em  $Rag-2^{-/-} \gamma c^{-/-}$  ( $T^-$ ,  $B^-$ ,  $NK^-$ ) (GUIMOND et al., 1997; GUIMOND et al., 1998; CROY et al., 2000). Embora tenham sido caracterizadas como células *Natural Killer*, a morfologia e comportamento peculiar destes linfócitos sugerem que eles representam um subtipo específico do útero durante a gestação, o que lhes conferiu a denominação de células *Natural Killer* uterinas (*uNK*) (CROY; KISO, 1993; KING; LOKE, 1991; HEAD, 1996; VAN DEN HEUVEL et al., 2005).

Segundo Ashkar e Croy (1999), as células *uNK* produzem  $IFN-\gamma$  e essa produção atinge o pico por volta do 10<sup>o</sup> ddg, estágio em que há um aumento da expressão de eomesodermin (eomes) no endométrio, molécula que parece estar envolvida na regulação da ativação das células *uNK* para secreção de  $IFN-\gamma$  (Tayade et al., 2005). Após o período que compreende a metade da gestação, tais células decaem em número tanto em camundongos, em ratos, como em humanos. Por volta do 12<sup>o</sup> dia de gestação, células *uNK* em mitose não são mais encontradas, e a fragmentação da cromatina destas células é um identificador de sua morte por processo de apoptose (DELGADO et al., 1996).

As *uNK* de camundongos expressam asialo-GM1; *NK1.1*, *Thy-1*, *PcR*, *4H12* e *CD45* (PARR et al., 1990; BERNARD et al., 1978; MUKHTAR, 1989; REDLINE; LU, 1989; LINNEMEYER; HAMILTON, 1990; CROY; KISO, 1993; MASSON et al., 1995; KISO et al., 1992). Os grânulos citoplasmáticos destas células contêm perforina, serina esterases, fosfatases entre outras (PARR et al., 1990; PEEL, 1989) e glicoproteínas incluindo *Muc-1* (CROY et al., 1997). No entanto, a expressão de receptor de estrógeno parece não ser diretamente requerida para a diferenciação e desempenho do papel funcional das células *uNK* (BORZYCHOWSKI et al., 2003).

Apesar de todo o conhecimento a respeito da atividade citotóxica exercida por outras células *NK*, as células *uNK* de camundongos não são capazes de lisar células de mielona YAC-1 *in vitro* (STEWART e PELL, 1993) e não existem também evidências

*in vivo* da degranulação destas células que indiquem sua atividade citotóxica (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR; CROY, 1999).

As células CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup> de humanos são as análogas às *uNK* de camundongos. Tais células surgem no útero humano durante a fase secretora do ciclo menstrual, e se mantêm durante a gestação, constituindo mais de 70% dos leucócitos decíduais (LOKE; KING, 2000). De acordo com Hiby e colaboradores (1997), as *uNK* de humanos possuem um repertório completo de receptores *KIR* (*Killer immunoglobulin-like receptors*), envolvidos na ativação e inibição da citotoxicidade das células *NK* (LANIER, 1998; TROWSDALE, 2001; RAULET et al., 2001). Segundo Varla e colaboradores (2005), os receptores *KIR* inibitórios da citotoxicidade estavam ausentes das *uNK* em mulheres, cuja gestação evoluiu para aborto espontâneo, comprovando a importância destes receptores na inibição da citotoxicidade de *uNK* e para manutenção da gravidez.

Assim como os *KIR* de humanos, os receptores da família Ly49 (*Killer cell lectin-like receptors*) de camundongos são expressos em células *NK* e reconhecem e se ligam ao MHC-1. Esta ligação ao MHC possibilita a ativação ou inibição da atividade *NK* (TROWSDALE, 2001; RAULET et al., 2001; BRENNAN et al., 1996; KING et al., 2000).

Em células *NK* de camundongos o reconhecimento do MHC durante a resposta imune inata ocorre primeiramente via receptores Ly49 (MAKRIGIANNIS; ANDERSON, 2001). Ao contrário dos *KIR* em humanos, os Ly49 de camundongos são receptores transmembrana do tipo II, e constituem uma família de 11 genes (Ly49A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, Q) e 4 pseudogenes no genoma de camundongos C57BL/6 (B6), além de pelo menos 9 outros genes adicionais identificados em outras raças de camundongos (SMITH et al., 1994; MCGUEEN et al., 1998; KUSAKABE et al., 2007). Estes genes estão localizados no cromossomo 6 em uma região designada "*Natural Killer gene complex*" (PLOUGASTEL e YOKOYAMA, 2006). Curiosamente, um dado gene Ly49 é expresso em apenas um subtipo de célula *NK* e parece que genes Ly49 individuais são escolhidos por meio de um processo aleatório durante uma distinta janela de oportunidade (MAKRIGIANNIS; ANDERSON, 2001).

O primeiro receptor Ly49 identificado em *NK* foi o Ly49A. Karlhofer e colaboradores (1992) demonstraram que este receptor está envolvido na inibição da

atividade lítica das células *NK* quando ligados em moléculas do MHC de classe I H-2D<sup>d</sup> e D<sup>k</sup> expressos em células alvo. Função similar foi proposta para o Ly49G, no entanto, a inibição da atividade lítica de *NK* por parte deste receptor é observada apenas quando as células alvo expressam grande quantidade de receptores do MHC de classe I do tipo H-2D<sup>d</sup> e/ou L<sup>d</sup> (MASON et al., 1995). Além disso, foi demonstrado que células *NK* Ly49C<sup>+</sup> têm a capacidade de se ligarem a múltiplos haplotipos de H-2 incluindo H-2D<sup>d</sup>, H-2<sup>k</sup>, H-2<sup>s</sup> e H-2<sup>b</sup> (YU et al., 1996).

Enquanto os Ly49A, C e G são apontados como inibidores, tem sido demonstrado que os Ly49 D e H podem ativar as células *NK*. Sabe-se que um Ly49 inibidor possui um ITIM (“*immunoreceptor Tyrosine-based inhibitory motif*”) em seu domínio citoplasmático. Este imunoreceptor se torna fosforilado em resposta à ligação ao Ly49 levando assim, ao recrutamento de SHP-1 fosfatase e atenuação da sinalização intracelular (OLCESE et al., 1996; NAKAMURA et al., 1997).

O Ly49D, por sua vez, necessita da associação de uma molécula sinalizadora adicional (DAP-12) que contem um ITAM (“*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*”) para poder transmitir o sinal de ativação (MASON et al., 1998; LANIER et al., 1998). Para a ligação do DAP-12 é preciso um resíduo transmembrana de arginina contido no Ly49D e este resíduo está também presente no Ly49H (MAKRIGIANNIS; ANDERSON, 2001).

Smith e colaboradores (1998) demonstraram que o Ly49H se associa ao DAP-12 sugerindo que este também possa atuar como ativador da atividade lítica de *NK*. Os 4 subgenes de Ly49 descritos em camundongos B6 são similares ao Ly49D ou ao Ly49H o que significa que estes também podem ser ativadores (MCQUEEN, 1998; SILVER et al., 2001).

Estudo recente (KUSAKABE et al., 2007), demonstrou que o tratamento de camundongos com danazol, uma droga frequentemente utilizada para o tratamento de endometriose em clínicas de fertilização “in vitro”, provocou um aumento na expressão nos genes para Ly49A, Ly49C, integrina  $\alpha 5$  e M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófago), no útero de camundongos do 1º ddg, sugerindo que a atuação do danazol na promoção da gravidez se deve ao recrutamento das células *uNK* propiciado por esta droga.

Estudos fenotípicos evidenciaram a existência de dois subtipos diferentes de células *uNK* em humanos, o que lhes conferiu na literatura duas maneiras diferentes de denominá-las, as células *Natural Killer* endometriais (*eNK*) (PACE et al., 1989; MANASTER et al., 2008) e células *Natural Killer* decíduais (*dNK*) (HO et al., 1996; HANNA et al., 2006; MANASTER; MANDELBOIM, 2010).

As células *eNK* correspondem ao subtipo encontrado no endométrio uterino não gravídico, enquanto as *dNK* seriam aquelas que migram para o útero apenas no momento da gestação (MANASTER; MANDELBOIM, 2010). Estudos demonstraram que, apesar de ambas expressarem Receptores *KIR*, semelhante às  $CD56^{\text{dim}}$  e ambas possuírem grânulos citoplasmáticos com conteúdo citolítico (HIBY et al., 2008), existe expressão diferencial de moléculas como  $CD16$ , que está presente em *dNK* e ausente em *eNK* (HO et al., 1996; HIBY et al., 2008; MANASTER; MANDELBOIM, 2010), ou *L-selectinas*, presentes nas *eNK* e ausentes nas *dNK* (ERIKSSON et al., 2004).

Assim como em humanos, em camundongos também é notada a existência de subtipos distintos de *uNK*, como descrito por Zhang e colaboradores (2010), que demonstraram a existência de *uNK*  $PAS^+DBA^+$ , que parecem ter precursores circulantes, e *uNK*  $PAS^+DBA^-$ , com precursores intra-uterinos. Segundo esses autores, estas duas populações de células *uNK* também diferem com relação à sua funcionalidade, no que diz respeito à produção de citocinas e fatores angiogênicos.

Em função dos dados a respeito destas diferentes populações de células *uNK* (*eNK* e *dNK*) serem ainda fragmentados e não conclusivos, e para tornar mais claro a descrição destas células, utilizamos preferencialmente a nomenclatura “*uNK*” para nos referirmos à célula alvo de nosso estudo nesta dissertação.

## **2.2 FUNÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS**

As células *uNK* estão presentes de forma abundante no momento da implantação em diferentes espécies e estão em íntimo contato com as células trofoblásticas, sugerindo que estas sejam alvo das *uNK*. No entanto, sua proximidade ao trofoblasto extraviloso na interface materno-fetal sugere também que as células *uNK* possam reconhecer tais células como sendo oriundas do feto e apenas regular sua

invasão (LOKE; KING, 1995) uma vez que não apresentam atividade citotóxica contra elas (KING et al., 2000).

As *uNK* possuem grânulos citoplasmáticos bastante evidentes, os quais armazenam enzimas como a perforina e granzimas, indicando um potencial citolítico. Kopcow e colaboradores (2005) demonstraram que, apesar das células *uNK* apresentarem esse potencial, elas também mostram uma redução da sua capacidade citotóxica pela não expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I. Ao mesmo tempo em que tais células formam conjugados e polarizam CD2, LFA-1 e actina pelos contatos focais, também falham em polarizar os centros organizadores de microtúbulos e seus grânulos citoplasmáticos de conteúdo lítico, e isso pode ser um indicativo da falta de citotoxicidade.

Em mulheres, durante a fase secretória do ciclo menstrual é observado o grande aumento em número das células *uNK* que se mantém neste ambiente na gestação. Se a gestação não ocorrer estas células decaem em número, com isso, ocorre uma redução na produção de fatores solúveis que mantém a integridade vascular o que pode estar relacionado com o desencadeamento da menstruação. Portanto, as células *uNK* podem ser importantes nos processos de renovação, diferenciação e descamação do endométrio durante o ciclo menstrual (IGARASHI et al., 2001; TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Estudos realizados por Li e colaboradores (2001) corroboram essa hipótese, uma vez que foi verificado a expressão de fator de crescimento endotelial C (VEGF-C), fator de crescimento placentário (PLGF), e angiopoetina 2 (Ang-2) na fase secretória, dando estabilidade às artérias endometriais nesse período.

A invasão do trofoblasto extraviloso na decídua e artérias espiraladas é essencial para o estabelecimento do suporte sanguíneo materno ao feto. Tal processo deve ser cuidadosamente controlado, uma vez que uma invasão exacerbada ou reduzida pode causar conseqüências indesejadas para a gestação, como por exemplo: pré-eclampsia, déficit de crescimento intra-uterino, parto prematuro, aborto e até mesmo complicações como placenta acreta (PIJNENBORG et al., 1983).

O íntimo contato sugere que as células *uNK* exercem influência sobre a invasividade das células trofoblásticas, no entanto, tal influência não ocorre por meio da citotoxicidade, apesar da presença de receptores de ativação como *NKp46*, *NKp44*,

*NKp30*, *NKG2D* e *2B4* (KOPCOW et al., 2005; VACCA et al., 2006; HANNA et al., 2006) sua citotoxicidade é reduzida em comparação com as células *cNK*.

De acordo com Trundley e Moffet (2004) a função das células *uNK* pode ser modificada após a ligação de seus receptores com moléculas de MHC não clássicas (HLA-G, HLA-E e HLA-C) expressas pelas células trofoblásticas, e essa modificação pode influenciar na invasividade trofoblástica.

O mecanismo mais aceito da regulação da invasividade trofoblástica pelas células *uNK* é com relação a produção de citocinas. Elas secretam uma grande quantidade de fatores de crescimento e citocinas, tais como: Ang-2 (DUNK et al., 2000), Fator de Necrose Tumoral –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (BAUER et al., 2004), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e Fator de Crescimento Tumoral –  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (GRAHAM et al., 1994) que parecem exercer influência inibitória na capacidade de invasão do trofoblasto; além dessas, a IL-8 e proteína induzida por interferon 10 (IP10) também secretadas pelas células *uNK* se ligam à receptores das células trofoblásticas induzindo sua migração (HANNA et al., 2006).

Estudos realizados por Von Rango e colaboradores (2003) demonstraram por métodos imunocitoquímicos que muitas células trofoblásticas em apoptose se encontravam rodeadas por células *uNK*, o que leva a duas interpretações: ou as células *uNK* desencadearam o processo de apoptose das células trofoblásticas; ou elas foram recrutadas após a apoptose ter sido iniciada.

A função principal das células *Natural Killer* uterinas está relacionada com a manutenção da homeostasia gestacional e controle do remodelamento vascular. Estudos utilizando camundongos prenhes transgênicos *tge26* (*NK* T<sup>-</sup> B<sup>+</sup>) demonstraram alta taxa de perda gestacional, e os fetos que sobreviviam apresentavam placenta reduzida e remodelamento incompleto das artérias espiraladas do útero (GUIMOND et al., 1998).

As células *uNK* são capazes de produzir fatores angiogênicos como os pertencentes à família VEGF, PLGF, Ang-2 e *NKG5* que medeiam a transformação das artérias espiraladas (HANNA et al., 2006).

Estudos realizados por Ashkar e Croy (1999) mensuraram a concentração de IFN- $\gamma$  em homogeneizados da região mesometrial de sítios de implantação embrionárias

e identificaram o aumento significativo dessa citocina pro-inflamatória no início da gestação (entre 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> ddg), período este que coincide com o aumento em número das células *uNK*. O pico de concentração de IFN- $\gamma$  ocorre de maneira concomitante ao pico do número de células *uNK* (10<sup>o</sup> ddg). Após esse período, tanto a concentração de IFN- $\gamma$  quanto a quantidade de *uNK* decaem até o final da gestação. A produção de IFN- $\gamma$  pelas células *uNK* parece ocorrer por estímulo de citocinas pró-inflamatória como IL-12, IL-15 e IL-18 (YU et al., 2006)

Segundo esses mesmos autores, nos sítios de implantação de camundongos *Knockout* para IFN- $\gamma$  ou para receptores dessa citocina (IFN- $\gamma$ R1), eram encontradas muitas *uNK*, *no entanto, estas possuíam tamanho reduzido (indiferenciadas)*, e a modificação das artérias espiraladas não pôde ser constatada.

Portanto, as células *uNK* em camundongos parecem estar relacionadas com a liberação de citocinas como IFN- $\gamma$  que leva à dilatação das artérias espiraladas decíduais e manutenção da integridade decidual (ASHKAR; CROY, 1999; ASHKAR et al., 2000). Além do INF- $\gamma$ , as *uNK* de camundongos também secretam fator estimulador de colônias-1 (*CSF-1*) que contribui para a diferenciação de macrófagos no útero (POLLARD et al., 1991), *IL-1*, fator inibitório de leucemia (*LIF*) (CROY et al., 1991), fator de necrose tumoral (*TNF- $\alpha$* ) e *VEGF* (LASH et al., 2006).

As células *uNK* de camundongos expressam o gene para a óxido nítrico sintase induzida iNOS (HUNT et al., 1997), e o óxido nítrico (NO) derivado dessas células também é importante para o desenvolvimento da vascularização uterina durante a gestação (GUIMOND et al., 1997), uma vez que camundongos deficientes em iNOS apresentaram anormalidades no desenvolvimento dos vasos, sugerindo que a produção de NO pelas *uNK* estaria relacionada com o relaxamento das artérias espiraladas uterinas (BURNETT; HUNT, 2000).

Em camundongos, as células *uNK* parecem contribuir para o desenvolvimento normal da placenta e decídua (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR et al., 2000; CROY et al., 2003<sup>a</sup>; CROY et al., 2003<sup>b</sup>). As células *uNK* de humanos podem exercer papel semelhante, visto que estas também produzem moléculas angiogênicas (LANGER et al., 1999; LI et al., 2001; CROY et al., 2003<sup>b</sup>).

Outra citocina secretada durante a gestação é a interleucina-10 (IL-10), que apresenta um papel fundamental na gestação por exercer ação imunossupressora e anti-inflamatória ao se relacionar com outros moduladores intra-uterinos (MOORE et al., 2001). A expressão do mRNA para IL-10 foi observada por várias células imunológicas como células T, células B, macrófagos, células dendríticas e células *NK*, assim como as *Natural Killer* uterinas (MOORE et al., 1993; VIGANO et al., 2001). Algumas populações celulares não imunológicas também são responsáveis pela produção de IL-10 como, por exemplo, as células trofoblásticas e decíduais, tanto em camundongos quanto em humanos, e nesse último, o período de produção mais expressivo ocorre no segundo trimestre da gestação (HANNA et al., 2000; LIN et al., 1993; PLEVYAK et al., 2002; ROTH et al., 1996). Segundo Hanna et al. (2000), os receptores para IL10 (IL-10R) são amplamente expressos na interface materno fetal tanto pela placenta, quanto pelas células decíduais, e tal expressão parece persistir até a prenhez a termo.

Em estudos realizados por Murphy e colaboradores (2009), foi demonstrado que ao submeter camundongos *knockout* para IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) à baixas doses de LPS, as células *uNK* tiveram sua citotoxicidade aumentada invadindo a zona placentar em função da sepse, o que causou morte fetal ou restrição do crescimento intra-uterino de maneira independente dos níveis de progesterona. Segundo o mesmo autor, a administração de IL-10, a imunossupressão das *uNK* ou o tratamento com anti-*TNF- $\alpha$*  Ab, reverteu os efeitos causados pela sepse na gestação, enfatizando que a regulação de IL-10 e ativação de *uNK* estão intimamente relacionadas e são de fundamental importância para a prevenção da inflamação e para evitar complicações gestacionais como o parto prematuro, por exemplo.

Em um modelo experimental de camundongo onde foi procedida a lesão embrionária (ROMAN, 2001), foi observada intensa reabsorção embrionária caracterizando a perda fetal, e alterações na marcação dos grânulos citoplasmáticos avaliadas pela citoquímica de lectina DBA. As alterações observadas nesta célula sugeriram a degranulação das células *uNK*, pressupondo uma resposta destas células às células trofoblásticas gigantes que poderiam ter sua atividade invasiva alterada por meio da lesão embrionária. Segundo Lippe (2007) as alterações no padrão de

reatividade para Lectina DBA encontradas após inoculação de LPS eram idênticas às ocasionadas pela lesão embrionária.

Tais achados, provenientes tanto do estudo pós inoculação de LPS, quanto do estudo pós-lesão embrionária, sugeriram que além de atuar nos vasos para manutenção da integridade da decídua e embrião, as células *uNK* podem realizar atividade citotóxica em situações que ativem esta função.

### **2.3 SEPSE E GESTAÇÃO**

Em países industrializados cerca de 5 a 11% das crianças nascem prematuramente. O número de partos prematuros, antes de 32 semanas de gestação, é responsável por cerca de 70% das mortes e mais de 75% das morbidades neonatais levando a um déficit neurocognitivo e a disfunção pulmonar nestas crianças (SLATTERY et al., 2002). A infecção intra-uterina foi reconhecida como a causa primária de partos prematuros e corrobora para o desenvolvimento de leucomalácia periventricular e displasia broncopulmonar (GOLDENBERG et al., 2000; SLATTERY et al., 2002; YOON et al., 2003). Mesmo sem manifestações clínicas a infecção intra-uterina desencadeia na interface materno-fetal um mecanismo inflamatório que envolve a produção de citocinas, uterotônicos potentes, e metaloproteases, o que resulta em diminuição prematura do comprimento cervical uterino, contração uterina, ruptura das membranas fetais causando o parto prematuro (SCHMITZ et al., 2007).

A ativação da resposta imune ocorre a partir da liberação de padrões moleculares associados ao patógeno, ou seja, endotoxinas da parede celular de gram-negativos (lipopolissacarídeos) e exotoxinas de alguns gram-positivos (peptideoglicanas, ácido lipoteicóico). Tais componentes interagem com receptores específicos na superfície de monócitos, denominados *toll-like receptors (TLR)*, resultando em uma complexa cascata de eventos que envolvem a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e a liberação de mediadores inflamatórios (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005; GUINN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

As células T CD4 ativadas podem produzir citocinas com atividade pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-2), ou citocinas com atividade antiinflamatória (IL-4, IL-10). Os fatores que determinam a predominância de Th1 ou Th2 na sepse permanecem desconhecidos, mas parecem ser influenciados pelo tipo de patógeno, tamanho do inóculo e local da infecção. Inicialmente, a sepse é caracterizada pelo aumento de mediadores inflamatórios, porém, com a progressão do quadro, há uma mudança para um estado de imunossupressão (HOTCHKISS; KARL, 2003).

A reação inflamatória inicial leva à geração de radicais livres e óxido nítrico sintase. A produção de óxido nítrico ativa a guanilato ciclase solúvel e gera GMP cíclico, causando desfosforilação da miosina na parede muscular dos vasos, além de levar à captação de cálcio, ou seja, diminuição de cálcio intracelular e, conseqüentemente, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SHEFFIELD, 2004; LANDRY; OLIVER, 2001).

Estudos recentes mostram também que o óxido nítrico em excesso inibe a função mitocondrial da musculatura esquelética, o que dificulta a oxigenação adequada deste tecido (SILVA et al., 2008).

A resposta hemodinâmica acontece precocemente; a redução da resistência vascular leva a queda da pressão arterial, o que provoca taquicardia por estímulo aos barorreceptores. Com isso, há aumento do débito cardíaco e ativação do sistema renina-angiotensina (GUINN et al., 2007).

Estudos em mulheres demonstraram grande concentração das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  no líquido amniótico, e aumento da concentração de muitas outras citocinas e quimocinas em pacientes os quais tiveram partos prematuros comparado com aqueles com parto a termo (ROMERO et al., 1995). A injeção sistêmica ou intra-uterina de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bactérias mortas, ou produtos de bactérias induz também o parto prematuro de camundongos e de outros animais (ELOVITZ; MRINALINI, 2004).

A inflamação pode ser induzida em animais experimentais através da exposição à produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, principalmente o lipopolissacarídeo (LPS), mimetizando várias das respostas inflamatórias de fase aguda, sem causar infecção ao hospedeiro (BURRELL, 1994). Tal inflamação pode, portanto, induzir anorexia, pirexia, anedonia e várias alterações comportamentais

como: a sonolência, redução da atividade motora e exploratória, bem como acentuado estado depressivo (KLUGER, 1991; KENT et al., 1996; AVITSUR et al., 1999; DANTZER et al., 1998 a, 1998 b; HORI et al., 2000; LEONARD, 2001; OWYANG; HASLER, 2002; ENANGA et al., 2002; STEINER; BRANCO, 2003; ROMANOVSKY, 2004; MATSUMURA; KOBAYASHI, 2004; DINARELLO, 2004; BLATTEIS et al., 2005; DUNN et al., 2005; ROMANOVSKY et al., 2005; ROMANOVSKY et al., 2006).

Durante a gestação, ocorre diminuição da resistência vascular periférica por influência de mediadores como prostaciclina, óxido nítrico e hormônios gestacionais; e aumento da frequência cardíaca, com conseqüente queda da pressão arterial e aumento do débito cardíaco. Isso pode não somente mascarar sinais iniciais de sepse, como também piorar a hipoperfusão normalmente associada ao quadro (GUINN et al., 2007). Com isso, após o sexto mês de gestação, ocorre queda da hemoglobina e do hematócrito, constituindo a chamada “anemia fisiológica da gestação” (REZENDE; MONTENEGRO, 2003) que compromete a oferta de oxigênio aos tecidos. A hipoperfusão uterina e fetal decorrente deste fenômeno pode levar a acidose metabólica fetal (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005).

Estudos realizados por Guinn (2007) e Rezende e Montenegro (2003) demonstraram que o sistema respiratório também sofre alterações, as quais têm por objetivo aumentar a oferta de oxigênio para mãe e feto e incluem o aumento do volume corrente associado à redução do volume residual, sem alterações na capacidade pulmonar total – com isso, a expiração materna se torna mais completa e há maior quantidade de ar a ser inspirado. Ocorre aumento do volume-minuto em 30 a 40%.

Segundo os mesmos autores, a progesterona promove o estímulo ao centro respiratório, levando à diminuição da PaCO<sub>2</sub> e como mecanismo compensatório ocorre a diminuição dos valores do bicarbonato sérico. A hiperventilação fisiológica cria maior gradiente de oxigênio do feto para a mãe. Durante a sepse, porém, isso dificulta uma resposta rápida à acidose metabólica e prejudica a oxigenação.

O tônus muscular em todo o trato gastrointestinal durante a gravidez se encontra diminuído, o que leva ao refluxo gastroesofágico, retardo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal lento (REZENDE; MONTENEGRO, 2003; GUINN et al., 2007). Tais mudanças, associadas a fenômenos da sepse – aumento da permeabilidade da

mucosa gástrica e lesão mucosa secundária a hipoperfusão – facilitam a ocorrência de translocação bacteriana e, portanto, uma piora do quadro clínico, além de aumentar o risco de pneumonia aspirativa (GUINN et al., 2007; FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005).

A gestação promove ainda mudanças na composição da bile, aumentando o risco de colelitíase; durante a sepse, ocorre também aumento da produção de citocinas inflamatórias pelas células de Kupffer (estimuladas tanto pela isquemia quanto por endotoxinas), levando a colestase, hiperbilirrubinemia e icterícia (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005).

As modificações gravídicas nos componentes do sistema de coagulação objetivam assegurar o domínio das perdas hemorrágicas no sítio placentário. Estas ocorrem a partir do primeiro trimestre, concomitantemente à elevação do estrogênio e da progesterona, que são os possíveis elementos causais desta modificação (REZENDE; MONTENEGRO, 2003). O estado pró-trombótico gestacional eleva substancialmente o risco de coagulação intravascular disseminado em pacientes com sepse (CASTRO et al., 2008).

A sepse durante a gestação é um evento dramático e ainda de alta mortalidade, cuja fisiopatologia permanece em contínua investigação. As alterações fisiológicas da gestação podem mascarar ou mesmo agravar o quadro clínico da sepse e, portanto, estudos são de fundamental importância para possibilitar o diagnóstico precoce, o qual é elemento crucial para o prognóstico materno e fetal (CASTRO et al., 2008).

## **2.4 NEUROIMUNOMODULAÇÃO**

Atualmente, muitos grupos de pesquisa vêm buscando integrar, em seus estudos, a atuação entre os sistemas imune (SI) e nervoso central (SNC). Tal integração, associada aos dados obtidos por esses grupos, acabaram por resultar na concepção de uma grande área de pesquisa conhecida como Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação. Esta área estuda os mecanismos através dos quais esses

sistemas trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Segundo a definição de Ader (2000), a Psiconeuroimunologia vem a ser a ciência que estuda as interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas e os processos imunes.

Um determinado organismo, que enfrenta desafios endógenos ou exógenos, tende a apresentar uma adaptação orgânica. Sendo este, o produto de um único e integrado sistema em que cada uma das partes evoluiu para executar uma função especializada. A partir disso, esta ciência segundo a definição de Ader (2000) não pode ser entendida completamente sem que se leve em consideração o organismo como um todo e os meios externos e internos no qual as respostas comportamentais e imunes ocorrem (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Há muito tempo as pesquisas na área da saúde buscam a compreensão dos mecanismos fisiológicos, implicados na regulação dos sistemas imune e nervoso. No entanto, estes estudos, anteriormente desenvolvidos de forma isolada e fragmentada, vêm cedendo espaço para pesquisas integradas, levando em consideração as complexas relações existentes entre os sistemas, que, de fato, veio trazer à tona a percepção de que esses sistemas são partes de uma rede de controle muito mais ampla (COSTA-PINTO et al., 2006).

Segundo Reiche e colaboradores (2004), a influência do sistema neuroendócrino exercida sobre o sistema imune foi primeiramente explicada por Hans Selye, que ao expor animais a um conjunto bastante diversificado de estímulos nocivos, que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, pôde observar alterações como hipertrofia das glândulas adrenais, úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos. Segundo esse mesmo autor, Selye encontrou tais alterações em todos os animais, independente do estímulo empregado, que o levou a concluir que representavam uma resposta orgânica à injúria, denominando-os de “síndrome de adaptação geral”, posteriormente chamada de estresse.

Como essa síndrome pode ser gerada por estímulos físicos e psicológicos e como tem decorrências tanto comportamentais quanto endócrinas, incluindo a

influência destas sobre a atividade de órgãos linfóides sobre células imunes, parece natural supor que o SNC e o SI interajam na preparação do organismo para acomodar mudanças impostas pelo estressor (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Segundo Licinio e Frost (2000), a ativação do eixo HPA e a conseqüente produção dos glicocorticóides durante o estresse são um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações da resposta imune encontradas no decorrer deste processo. Sabe-se serem os glicocorticóides capazes de inibir a transcrição de inúmeras citocinas, como de interleucina 1 (IL-1), IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulante de colônia (GM-CSF) (GUYRE et al., 1988). Inibem, ainda, a migração/quimiotaxia de eosinófilos e de neutrófilos (VAN OVERVELD et al., 2003). Com isso, observa-se uma diminuição da resposta imune celular e um aumento daquela dita humoral; nesta situação aumentam, no paciente estressado, a susceptibilidade às alergias e às doenças auto-imunes mediadas por anticorpos (ELENKOV et al., 2000).

Partindo-se do princípio de que há influência de mediadores do sistema imune sobre o SNC induzindo a ativação do eixo HPA, a resposta por eles desencadeada passa, então, a fazer parte do repertório daquelas que são chamadas coletivamente de adaptativas ou de síndrome de adaptação geral ao estresse; essas respostas envolviam classicamente apenas estímulos físicos ou psicológicos. Como definido por Blalock (1984), o sistema imune funcionaria, nessa situação, como um sistema sensorial adicional, difuso, dinâmico e em constante adaptação, que capacitaria o SNC a receber e processar estímulos e mensagens que, de outro modo, não seriam percebidos pelas vias sensoriais clássicas.

Além da ativação do eixo HPA e alterações nos níveis de citocinas observados em diversos trabalhos, o estresse também parece atuar por outra via, uma vez que os efeitos do estresse foram diminuídos em animais que sofreram simpatectomia cirúrgica. Evidenciando assim, e mais uma vez, a importância dos mecanismos simpáticos na modulação da resposta imune (PACHECO-LOPEZ et al., 2003).

Hugo Besendovisky, na década de 70, também avaliou as interações entre os sistemas nervoso e imune; porém, o fez em sentido oposto. Em 1975, demonstrou que a imunização de animais com diferentes antígenos induzia mudanças neuroendócrinas

e de atividade no SNC. Nascia, então, o outro braço da neuroimunomodulação: o estudo dos efeitos de produtos originários de processos imune/inflamatórios sobre a atividade do SNC (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Segundo esses mesmos autores, os estudos sobre os efeitos de citocinas na regulação de respostas no SNC passaram, então, a compreender dois enfoques diferentes e complementares: a tentativa de isolamento de moléculas e das vias essenciais para a sinalização do SI para o SNC, e o estudo das alterações comportamentais no contexto em que se inserem, ou seja, como parte do repertório de comportamentos expressos pelos animais. Neste sentido, começa a ficar cada vez mais claro que as alterações de comportamento decorrentes de uma infecção não são conseqüências de uma depressão inespecífica do SNC, mas sim, de um conjunto de adaptações específicas e muito bem organizadas nesse sistema.

Conforme já descrito anteriormente, a ativação do sistema imune por endotoxina resulta em várias alterações comportamentais, que são coletivamente chamadas de comportamento doentio. Estudos comportamentais em animais de laboratório são muito utilizados para avaliar efeitos farmacológicos através da análise de parâmetros relacionados à efeitos ansiolíticos, ansiogênicos, antidepressivos e retenção de memória (ALMEIDA et al., 2001; SOUSA et al., 2004).

Um teste criado na década de 80, bem descrito na literatura e que tem a finalidade de mensurar comportamentos relacionados à ansiedade é o Labirinto em cruz elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; PELLOW; FILE, 1986). Sua utilização como medida de ansiedade é baseada na aversão incondicionada do animal por lugares abertos e sua confiabilidade como método para avaliar tal comportamento é baseada em sua sensibilidade a inúmeros agentes ansiolíticos e ansiogênicos (HOGG, 1996). O tempo gasto em cada braço, o número de entradas nos braços abertos e as porcentagens de tempo e entradas são seus parâmetros mais usados, sendo a permanência nos braços abertos um índice confiável de ansiedade (PELLOW et al., 1985).

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predispõem um indivíduo à depressão. Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem

psicossocial (POST, 1992). Para a análise de atividade depressiva, o experimento de Nado Forçado é muito utilizado em pequenos roedores, sendo este, um bom modelo para indução de estresse (PORSOLT et al., 1977).

Outro estudo utilizado na farmacologia é o Teste de Reconhecimento espontâneo de objetos. Desenvolvido por Ennaceur e Delacour (1988) se trata de um teste não aversivo e não espacial que tem sido cada vez mais utilizado como uma poderosa ferramenta na avaliação de efeitos de drogas sobre a memória (ABE et al., 2004; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; NORMAN; EACOTT, 2004; OKUDA et al., 2004; RAMPON et al., 2000). Ele se baseia na preferência que o roedor apresenta em explorar um objeto novo. O Camundongo tende a explorar o objeto desconhecido por mais tempo do que o utilizado na exploração da cópia idêntica de um objeto já conhecido (a cópia idêntica é utilizada para evitar o efeito de memória pelo odor). No entanto, na ocorrência de uma falha mnemônica o animal tende a explorar os dois objetos igualmente (ABE et al., 2004; ENNACEUR; DELACOUR, 1988; NORMAN; EACOTT, 2004).

Além das alterações comportamentais causadas pela exposição ao LPS, foi descrito que em resposta à um estímulo inflamatório/infeccioso o sistema imune desencadeia a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (RAMACHANDRA et al., 1992).

Estudo recente em camundongos prenhes (SCHMITZ et al., 2007) demonstrou que a injeção intrauterina de LPS de *E.coli* provoca aumento da expressão de Fosfodiesterase 4B (PDE4B) e da atividade fosfodienterose na interface materno-fetal, aumento nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-10 no líquido amniótico o que induz o parto prematuro e a diminuição da viabilidade fetal. No mesmo estudo, foi constatado que inibição de PDE4 por rolipram parece impedir o aparecimento destas citocinas pró-inflamatórias.

As células *uNK* de camundongos expressam o gene para a oxido nítrico sintase induzida iNOS (HUNT et al., 1997). Os mesmos autores relataram que a produção de iNOS pelas células *Natural Killer* uterinas está diretamente relacionada a sua diferenciação e esta produção é iniciada e sustentada por meio da progesterona.

Schmitz e colaboradores (2007), devido ao fato das células *uNK* se constituírem da maior população celular inflamatória do endométrio uterino de camundongos prenhes e seres humanos, utilizaram a citoquímica de lectina DBA para a identificação precisa destas células após injeção intrauterina de LPS. Em seus estudos estes autores observaram que o número total de células *uNK* aumentava após este tratamento e retornava ao normal após o uso de rolipram. No entanto, estes autores, não quantificaram os diferentes subtipos de células *uNK* contidos no endométrio, bem como, não analisaram a localização de cada um destes subtipos após o tratamento com LPS, tão pouco associaram alterações imunológicas (em células *uNK*) durante a sepse na gestação com alterações comportamentais induzidas por um organismo que pretende proteger não apenas a si próprio, mas também sua cria em desenvolvimento.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Avaliar os efeitos da administração de LPS no comportamento, útero e células *uNK* de camundongos prenhes por meio do estudo etológico, morfológico, citoquímico e estereológico.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o comportamento de camundongos prenhes sob inflamação induzida por LPS nos parâmetros relacionados à ansiedade, depressão e memória de reconhecimento de objetos; e relacionar esses resultados aos obtidos através dos mesmos estudos comportamentais realizados em camundongos prenhes normais.

- Analisar a morfologia do útero e das células *uNK* de camundongos prenhes submetidos ao tratamento por LPS.

- Avaliar a expressão de N-Acetil-D-Galactosamina nas células *uNK* por meio da citoquímica de lectina DBA em cortes histológicos de útero de camundongos submetidos ao tratamento com LPS.

- Quantificar a incidência e distribuição dos 4 subtipos de células *uNK* DBA reativos em cortes histológicos de útero de camundongos submetidos ao tratamento com LPS.

## **4 MATERIAL E METODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados 60 camundongos fêmeas Swiss, provenientes do Biotério da Unifal-MG e mantidos em regime de alimentação e acesso à água *ad libitum*, mantidos em ciclo de 12/12 horas claro e escuro. Estes animais foram acasalados com machos da mesma linhagem e o dia em cuja manhã foi constatada a presença da rolha vaginal foi considerado como sendo o 1º ddg. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Unifal-MG.

### **4.2 Organização dos Grupos Experimentais**

Todos os camundongos fêmeas prenhes foram analisados no 10ºddg, período em que ocorre o pico na produção de IFN- $\gamma$  (Ashkar e Croy, 1999) e na quantidade de células *uNK* (PAFFARO JR et al., 2003). Dos 60 camundongos fêmeas, 10 animais tratados com soro fisiológico (SF) e 10 animais sem qualquer tratamento foram utilizados sequencialmente para o estudo comportamental, morfológico, citoquímico e estereológico. Além disso, 10 animais para cada período de teste (30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas após o tratamento) sofreram a injeção intraperitoneal de SF + LPS (100 $\mu$ L/Kg do animal). Estes foram submetidos aos testes comportamentais e tiveram seus sítios de implantação embrionária coletados para os estudos morfológicos, citoquímico e estereológico, como demonstrado na Tabela 1.

Todos os 60 animais tiveram sua temperatura corporal mensurada, via retal, por termômetro digital.

**Tabela 1** – Animais utilizados no estudo comportamental, morfológico, citoquímico e estereológico.

<b>Animais</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Teste Comportamental</b>	<b>Coleta</b>
<b>n=10</b>	<b>Salina+LPS</b>	<b>30 min</b>	<b>SIE</b>
<b>n=10</b>	<b>Salina+LPS</b>	<b>1 hora</b>	<b>SIE</b>
<b>n=10</b>	<b>Salina+LPS</b>	<b>2 horas</b>	<b>SIE</b>
<b>n=10</b>	<b>Salina+LPS</b>	<b>4 horas</b>	<b>SIE</b>
<b>n=10</b>	<b>Salina</b>	<b>1 hora</b>	<b>SIE</b>
<b>n=10</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>SIE</b>

- SIE = Sítio de Implantação embrionária no 10º ddg.
- LPS de *E.coli* sorotipo 026:B6 a 100 µg/Kg.

Fonte – Do Autor.

### **4.3 Estudo Comportamental**

Para o estudo comportamental foram utilizadas fêmeas prenhes que receberam, intraperitonealmente e no 10ºddg, a injeção de LPS de *E.coli* sorotipo 026:B6 na dose de 100 µg/Kg. As avaliações comportamentais dos parâmetros de ansiedade, depressão e memória foram realizadas nos períodos de 0,5, 1, 2 e 4 horas pós-tratamento com LPS, sendo utilizados, portanto, 10 animais em cada período. Outros camundongos receberam apenas injeção de soro fisiológico intraperitoneal como controle e estes tiveram seus comportamentos analisados pelos mesmos aparatos utilizados no grupo experimental. Animais no 10º ddg, não submetidos a nenhum tratamento foram também utilizados (TABELA 1). Todos estes animais foram submetidos aos mesmos testes, ou seja, respectivamente o teste do labirinto em cruz, seguido do teste de reconhecimento de objetos e finalmente o teste de nado forçado.

### 4.3.1 Análise de ansiedade

O labirinto em cruz elevado é um método bem conhecido para detectar o efeito de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas (FILE, 2001) e foi usado como modelo de avaliação de ansiedade nesse estudo. O teste do labirinto em cruz elevado consiste em um aparato com dois braços abertos (50 x 10cm cada), dois braços fechados (50 x 10 x 40cm cada) e uma plataforma central (10 x 10cm) formando uma cruz suspensa à 50cm de altura (**FIGURA 1**). Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).



**Figura 1** - Labirinto em Cruz Elevado utilizado para os testes comportamentais referentes aos parâmetros de ansiedade.

Fonte – Do Autor.

### **4.3.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos**

O teste de reconhecimento de objetos foi adaptado do modelo descrito anteriormente por Abe H, Ishida Y e Iwaski T (2004). Este teste foi dividido em 3 sessões: familiarização, teste e experimento. A sessão de familiarização foi realizada duas horas antes da próxima etapa, onde foi permitida a cada camundongo a exploração do ambiente no qual foram realizados os testes, com o intuito de promover a familiarização do animal com local. O ambiente consiste em uma caixa de madeira (65 x 45 x 45cm) forrada com maravalha (3cm de altura) (**FIGURA 2**). A sessão de teste foi a filmagem da exposição de 2 objetos idênticos (A1 e A2) à cada animal, no ambiente descrito acima por 5 minutos. Os objetos foram deixados no canto oposto do local onde o camundongo foi colocado. Foi mensurado o tempo gasto na exploração dos objetos A1 e A2 pelo camundongo pela análise do vídeo. Na fase de experimento, os objetos foram tocados por um terceiro (A3) objeto também idêntico aos 2 anteriores e por um quarto objeto (B) totalmente diferente, porém de volume semelhante. Os objetos da fase de experimento foram colocados no mesmo lugar dos objetos da fase teste e o camundongo foi exposto aos objetos e filmado por 5 minutos. Foi mensurado o tempo gasto na exploração de cada objeto. A exploração do objeto foi definida como direcionamento do focinho ao objeto (a uma distância de pelo menos 2 cm) e toque do focinho no objeto (ABE et al., 2004).

A exploração global (EG) dos objetos foi a soma dos tempos de exploração do primeiro e segundo objetos na sessão de treino.

$$\mathbf{EG = A1+A2}$$

A exploração global no teste (EGT) foi definida como sendo a soma dos tempos de exploração do terceiro e quarto objeto no teste.

$$\mathbf{EGT = B+A3}$$

A habituação (H) foi aferida pela diferença da exploração entre a sessão de treino e o teste:

$$H = ([A1+A2]-[B+A3])$$

A simples medida de reconhecimento (R) ou discriminação é a diferença entre o tempo gasto na exploração do novo estímulo (B) e o tempo gasto na exploração do estímulo familiar (A3), ou seja, B-A3. Entretanto, para minimizar influência dos níveis totais de exploração, é mais preciso utilizar a diferença no tempo de exploração dividida pelo tempo de exploração total:

$$R = B-A3 / B+A3$$



**Figura 2** - Aparato utilizado para os testes comportamentais referente aos parâmetros de memória de reconhecimento de objeto. A imagem representa a etapa de experimento (terceira etapa).

Fonte – Do Autor.

### **4.3.3 Análise de depressão**

Para detectar o efeito antidepressivo foi utilizado o teste do nado forçado (“*forced swimming test*”). Este teste foi desenvolvido por Porsolt; Bertin e Jalfre (1977) para a pesquisa com drogas antidepressivas. Para tanto, foi utilizado um cilindro vertical de vidro, com dimensões de 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, preenchido

com água à 30°C até a altura de 20 cm (**FIGURA 3**). O volume de água deve permitir que o animal possa nadar ou boiar (“float”) sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Para o teste, cada camundongo foi colocado no cilindro por 5 minutos e foi avaliado o tempo de latência com que o animal exibe o comportamento de boiar e o tempo total boiando (tempo em que o animal faz pequenos movimentos somente para manter a cabeça acima do nível da água). Somente os 4 últimos minutos foram analisados, de acordo com a metodologia de Porsolt.



**Figura 3** - Aparato utilizado para o teste comportamental do Nado Forçado, para avaliação dos parâmetros relacionados à depressão.

Fonte – Do Autor.

#### **4.4- Processamento para Embebição em Parafina**

Todos os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,05M pH7,4, e foram coletados os sítios de implantação embrionária. Estes espécimes foram desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol para embebição em parafina (Paraplast, Sigma Chemical Co. USA). Foram obtidos cortes histológicos dos blocos de parafina com espessura de 7µm e estes foram montados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina a 10%. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação morfológica e à histoquímica de lectina DBA.

#### **4.5 Citoquímica com lectina DBA (*Dolichos Biflorus agglutinin*)**

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados com xilol por duas vezes de 20 minutos, seguido da hidratação em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e água destilada, por cinco minutos em cada solução. Após hidratação os cortes foram submetidos a reação de citoquímica para lectina DBA da seguinte maneira:

- a. Lavagem dos cortes com *PBS (Phosphate buffer saline)* 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vols.) 1% em *PBS* 0,05M durante 30 minutos;
- c. Lavagem com *PBS* 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- d. Incubação com *PBS/BSA* (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e. Incubação com lectina *DBA (Dolichos biflorus)* biotinada (Sigma Chemical Co. USA) diluída na proporção de 1:300 em *PBS/BSA* 1% pH 6,8, *overnight*, a 4° C;
- f. Lavagem com *PBS* 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (*Sigma Chemical Co. – USA*) em *PBS* 0.05M na proporção de 1:300 por 1 hora;

- h. Lavagem com *PBS* 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- i. Incubação *DAB* (3-3 Diaminobenzidina) (*Sigma Chemical Co. – USA*) (250µL) + *PBS* 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vols. (20 µL).
- j. Lavagem com água destilada;
- l. Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;
- m. Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (*Níkon Eclipse 80i/Japan*) com câmera digital acoplada (*Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan*) e software de análise de imagens (*NIS-Elements/Nikon/Japan*).

O controle negativo foi realizado pela adição do glicoconjugado contendo N-Acetil-Galactosamina após a incubação com a Lectina DBA.

#### **4.6 Dupla marcação para lectina *DBA* (*Dolichos Biflorus agglutinin*) e perforina.**

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados com xilol por 20 minutos duas vezes, seguido da hidratação por cinco minutos em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e em água destilada. Após hidratação os cortes foram submetidos à reação de dupla marcação para citoquímica com lectina *DBA* e imunocitoquímica para perforina da seguinte maneira:

- a. Lavagem dos cortes com *PBS* (*Phosphate buffer saline*) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com *PBS/BSA* (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- c. Incubação com lectina *DBA* conjugada com fluoresceína (*Sigma Chemical Co. USA*) diluída na proporção de 1:300 em *PBS/BSA* 1% pH 6,8, por 1 hora em temperatura ambiente;
- d. Lavagem com *PBS* 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;

- e. Incubação com anticorpo primário anti-perforina feito em cabra (Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) diluído na proporção de 1:50 em *PBS/BSA* 1% pH 6,8, *overnight*, a 4° C.
- f. Lavagem com *PBS* 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g. Incubação com anticorpo secundário anti-cabra conjugada com Cy3 (Chemicon International, Inc. USA), diluído na proporção de 1:50 em *PBS/BSA* 1% pH 6,8, por 1 hora.
- h. Lavagem com *PBS* 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- i. Os cortes foram montados em glicerol tamponado para observação ao microscópio de fluorescência ( $\lambda=520$  and 560nm) (*Níkon Eclipse 80i/Japan*) com câmera digital acoplada (*Digital Sighth-Fi1/Nikon/Japan*) e software de análise de imagens (*NIS-Elements/Nikon/Japan*).

O controle negativo para a perforina foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti-perforina indicado no item 4.6 e.

#### 4.7 Imunocitoquímica para $\alpha$ -actina

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados com xilol por 20 minutos duas vezes, seguido da hidratação por cinco minutos em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e em água destilada. Após hidratação os cortes foram submetidos à reação de imunocitoquímica para  $\alpha$ -actina da seguinte maneira:

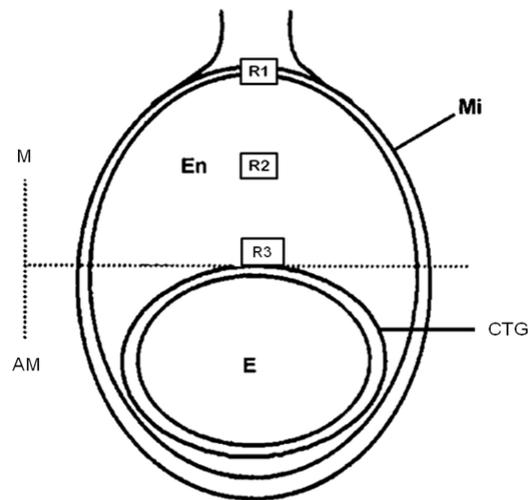
- a. Lavagem dos cortes com *PBS* (*Phosphate buffer saline*) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vols.) 1% em *PBS* 0,05M durante 30 minutos;
- c. Lavagem com *PBS* 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- d. Incubação com *PBS/BSA* (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e. Incubação com anticorpo anti- $\alpha$ -actina biotilado (Sigma Chemical Co. USA) diluído na proporção de 1:100 em *PBS/BSA* 1% pH 6,8, *overnight*, a 4° C.

- f. Lavagem com *PBS* 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (*Sigma Chemical Co. – USA*) em *PBS* 0,05M na proporção de 1:300 por 1 hora;
- h. Lavagem com *PBS* 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- i. Incubação *DAB* (3-3 Diaminobenzidina) (*Sigma Chemical Co. – USA*) (250µL) + *PBS* 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vols. (20 µL).
- j. Lavagem com água destilada;
- l. Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;
- m. Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (*Níkon Eclipse 80i/Japan*) com câmera digital acoplada (*Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan*) e software de análise de imagens (*NIS-Elements/Nikon/Japan*).

O controle negativo para a reação de imunocitoquímica para  $\alpha$ -actina foi realizado pela subtração o anticorpo primário anti-  $\alpha$ -actina indicado no item 4.6 e.

#### 4.8 Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica

Foram analisados, de forma aleatória, 3 cortes histológicos de 3 sítios de implantação embrionária distintos submetidos a citoquímica de lectina DBA, procedentes de 5 animais de cada grupo experimental para análise estereológica. Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste (AT) 200µm<sup>2</sup>, dos 4 subtipos distintos de *uNK* localizados em 3 regiões do útero prenhe de camundongos modificado a partir dos experimentos de Paffaro Jr et al., (2003) e representado na **Figura 4**. A delimitação destas 3 regiões obedeceram às variações decorrentes do crescimento uterino de acordo com o dia de gestação. A área teste foi delimitada através de um sistema de teste quadrático o qual possui duas linhas de exclusão e assim, foram contadas apenas as células que exibiram o núcleo localizado na área teste nos cortes observados, exceto aquelas que tocaram as duas linhas de exclusão do sistema teste.



**Figura 4** - Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10º ddg e áreas 1 (R1), 2 (R2) e 3 (R3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células uNK. M, Região mesometrial; AM, região antimesometrial; Mi, Miométrio; En, Endométrio; TGC, células trofoblásticas gigantes; E, Embrião.

Fonte: Modificado de Paffaro Jr et al. (2003).

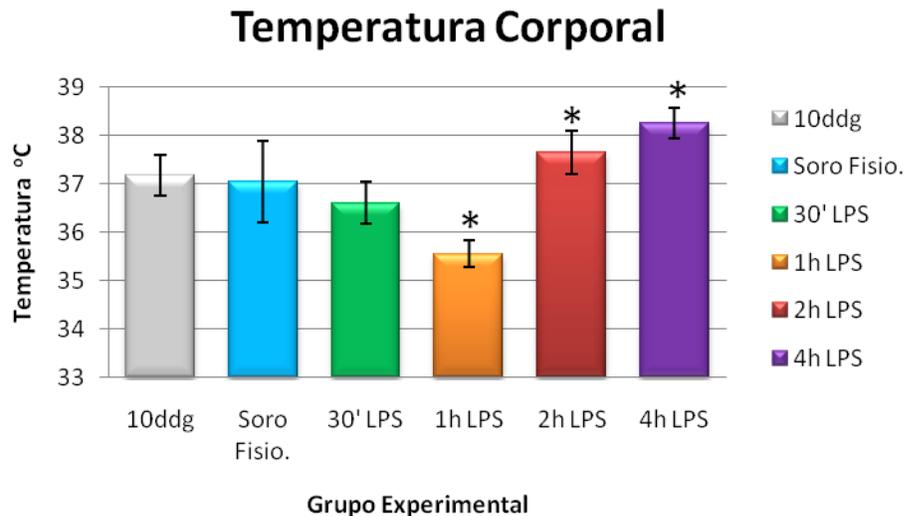
#### **4.9 Análise Estatística**

O estudo representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA) seguida do teste de comparação das médias de Scott-Knott. Quando os pré-supostos de normalidade e de homocedasticidade não foram satisfeitos, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativos de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O choque séptico é um desafio para a medicina, uma vez que é responsável por uma taxa bastante elevada de mortalidade, mesmo com tratamento adequado a base de antibióticos e vasopressores. Este estado doente é caracterizado por vasodilatação periférica das artérias, que resulta em diminuição na resistência vascular sistêmica, débito cardíaco elevado, hipotensão e perfusão tecidual inadequada em resposta a produtos bacterianos (GIUSTI-PAIVA et al., 2003; PARRILLO et al., 1990), tal estado doente, portanto, pode ser bastante prejudicial em mulheres grávidas que necessitam de perfusão uterina adequada e o modelo de camundongo prenhe submetido exposto ao LPS pode auxiliar no esclarecimento dos mecanismos envolvidos neste processo.

A literatura aponta que o choque causado por endotoxinas bacterianas é acompanhado de alteração na temperatura corporal, a partir disso, no presente estudo todos os animais utilizados tiveram sua temperatura mensurada (**GRÁFICO 1**).



**Gráfico 1** - O gráfico demonstra as médias da temperatura (°C) corporal obtidas em cada grupo experimental. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

Os camundongos prenhes no 10<sup>o</sup>ddg sem nenhum tratamento apresentaram uma média de 37,18°C da temperatura corporal. Tal média não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) quando comparada com a média obtida do grupo experimental onde foi administrado Soro Fisiológico (37,05).

Logo após a administração de LPS de *E.coli*, a temperatura corporal dos camundongos prenhes diminuiu ( $p<0,01$ ) de tal forma que após 1 hora ela alcançou a média de 35,67°C. Após esta queda inicial, a temperatura não apenas voltou a subir como ultrapassou a temperatura observada nos camundongos prenhes normais, alcançando médias de 37,65°C após 2 horas da aplicação do LPS e 38,24°C após 4 horas ( $p<0,05$ ).

O LPS tem efeito sobre o organismo a partir da sua ligação com seu receptor: o *Toll-like receptor 4 (TLR4)*, que é um dos 11 receptores *TLRs* conhecidos até o momento que são existentes em humanos (Belvin; Anderson, 1996). Essa ligação do LPS ao *TLR4* ocorre com o auxílio da proteína ligadora de LPS (LBP) que é produzida pelo fígado durante a resposta de fase aguda. Tal ligação desencadeia a ativação de uma cascata de sinalizadores intracelulares que culmina com a ativação de NF- $\kappa$ B (Beutler, 2000) que, por sua vez, ativa a transcrição de citocinas pro-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que participam do desenvolvimento da febre (Miyake, 2004; Janeway et al., 2007).

A atuação, no sistema nervoso central, das citocinas presentes no sangue após a inflamação ocorre de forma indireta, pelo fato destas citocinas não serem capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Os órgãos circunventriculares apresentam receptores para tais citocinas pró-inflamatórias, bem como *TLR4*, que na presença de seus ligantes favorecem a produção de prostaglandina ( $PGE_2$ ) (ENGBLOM et al., 2003) via COX-2, que ativam a população de neurônios-alvo no centro termorregulatório central através de receptores  $PGE_2$  específicos (USHIKUBI et al., 1998).

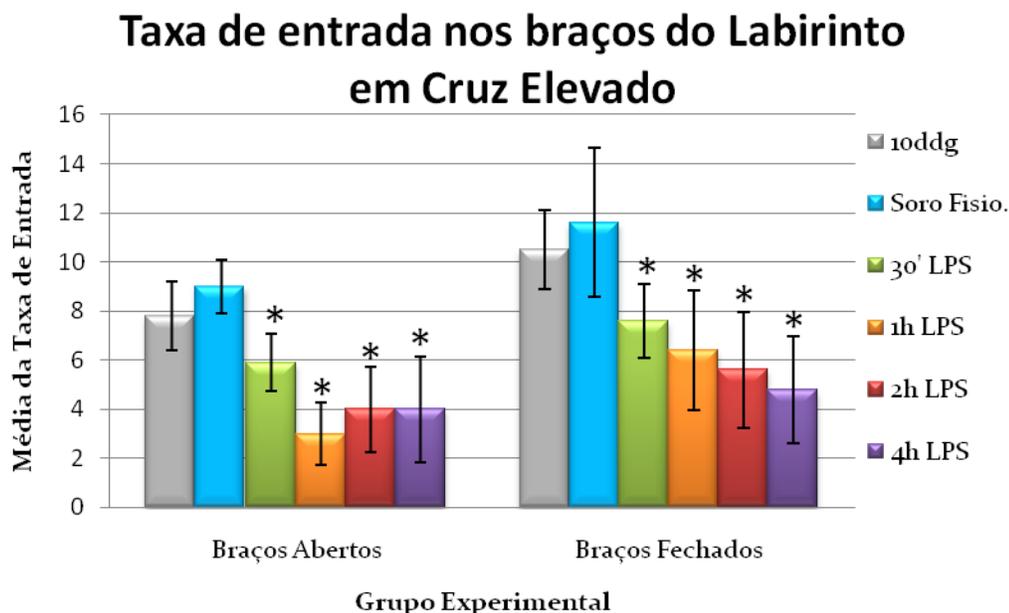
A febre apresenta um valor adaptativo para o animal, uma vez que favorece sua recuperação aumentando a proliferação de linfócitos, ativando neutrófilos envolvidos na destruição de bactérias, auxiliando a síntese de anticorpos e diminuindo a multiplicação de agentes termossensíveis (HART, 1988).

Os mecanismos que participam da regulação da temperatura durante a sepse ainda permanecem obscuros, no entanto, diversos aspectos devem ser considerados. A infecção leva o hospedeiro a desenvolver respostas adaptativas que podem ser resumidas em dois mecanismos. O primeiro é o mecanismo inflamatório, envolvendo as citocinas supracitadas, o segundo mecanismo é representado pela participação endócrina e antipirética envolvendo o eixo HPA, com liberação de vasopressina e outras moléculas que limitam a febre (GIUSTI-PAIVA, 2003).

Os resultados obtidos pelo presente estudo demonstram que a resposta do organismo do camundongo prenhe frente a essa dose de LPS, no que diz respeito ao desenvolvimento da febre, apresenta uma latência de aproximadamente duas horas (**GRÁFICO 1**). Esses resultados corroboram os encontrados por Giusti-Paiva e colaboradores (2003) que estudaram ratos machos, e atribuíram que a alteração da temperatura corporal se deve também ao comportamento bifásico dos níveis de vasopressina durante o choque séptico. Nesse estudo foi observado que até as duas primeiras horas após a administração de LPS ocorreu aumento nos níveis de vasopressina concomitante à queda da temperatura. Após duas horas foi verificado aumento de temperatura nestes animais e os níveis de vasopressina decaíram. Diversos estudos afirmam que a liberação de vasopressina é controlada pela ação de NO, como, por exemplo, o estudo que aponta que a infusão intra cérebro ventricular (i.c.v.) desse gás resulta em aumento nos níveis séricos de vasopressina (OTA et al., 1993). Neste sentido, nossos resultados demonstraram que a prenhez não foi capaz de alterar a resposta que culmina no estabelecimento da febre durante a sepse.

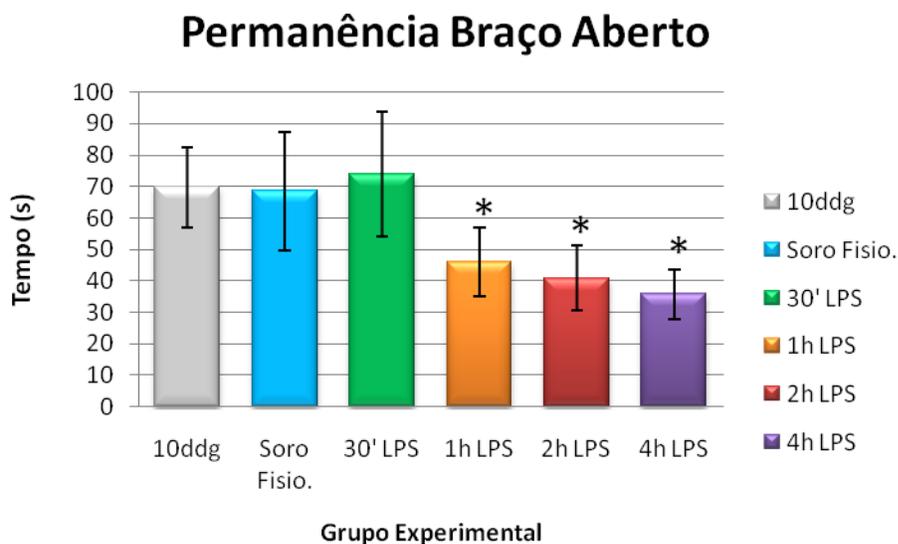
As mesmas citocinas pro-inflamatórias responsáveis pelo desenvolvimento da febre também influenciam o eixo HPA que resultam em alterações comportamentais, que recebem o nome de comportamento doentio.

A ansiedade faz parte desse conjunto de alterações comportamentais e para avaliar se a administração de LPS seria capaz de induzir tal alteração em animais prenhes, foi utilizando como aparato o labirinto em cruz elevado, onde os parâmetros avaliados foram taxa de entrada e taxa de permanência nos braços abertos e fechados.



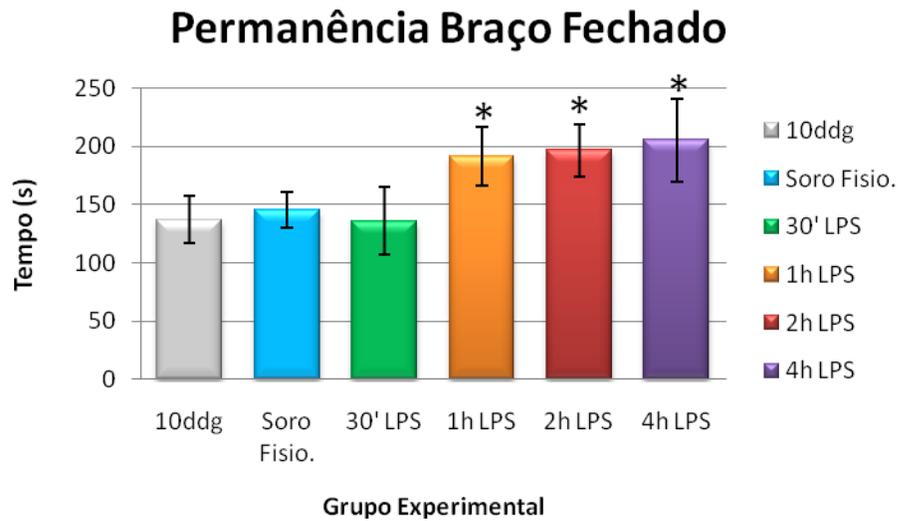
**Gráfico 2** - O gráfico demonstra as médias da taxa de entrada nos braços do Labirinto em Cruz Elevado que os animais de cada grupo experimental apresentaram. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.



**Gráfico 3** - O gráfico demonstra as médias do tempo (segundos) de permanência no braço aberto que os animais de cada grupo experimental apresentaram. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.



**Gráfico 4** - O gráfico demonstra as médias do tempo (segundos) de permanência no braço fechado que os animais de cada grupo experimental apresentaram. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

Foi observada redução (**GRÁFICO 2**) na capacidade exploratória dos braços do labirinto comparando o comportamento dos animais tratados com LPS com os apresentados pelos animais prenhes no  $10^{\circ}$  ddg sem nenhum tratamento ( $p < 0,05$ ).

Além disso, as taxas de permanência nos braços (**GRÁFICO 3**) indicam que após 30 minutos da administração de LPS os animais não apresentaram comportamento alterado nos parâmetros relacionados à ansiedade ( $p > 0,05$ ), e também não existe diferença significativa ao comparar o grupo normal ( $10^{\circ}$ ddg) com o grupo controle (Soro Fisiológico).

No entanto, a partir de 1 hora após a aplicação de LPS, os animais demonstraram comportamento de ansiedade crescente (até 4 horas após a aplicação), diagnosticado pelo aumento da taxa de permanência destes animais nos braços fechados (**GRÁFICO 4**) concomitante à diminuição da taxa de permanência nos braços abertos, demonstrando ação ansiogênica do LPS nestes animais.

O comportamento de ansiedade em camundongos frente ao tratamento com LPS já foi observado anteriormente em estudos utilizando o próprio labirinto em Cruz elevado, o Teste do Campo Aberto (SWIERGIEL e DUNN, 2007), e também outros

aparatos como o Teste do claro-escuro (PAIVA et al., 2010), sendo o último baseado na situação natural onde o animal é exposto a um ambiente desconhecido, e na preferência inata deste animal em permanecer no escuro. Neste último, a ansiedade é mensurada pelo tempo que o animal demora em passar para o ambiente claro, a quantidade de transições entre os ambientes, bem como o tempo de permanência no ambiente claro.

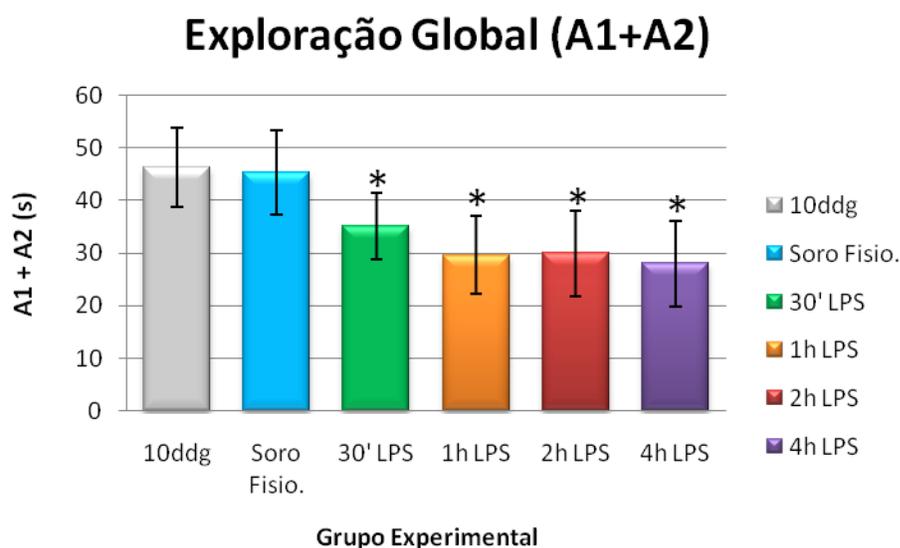
As alterações comportamentais frente ao tratamento se devem à produção de citocinas que influenciam a atividade cerebral através da indução de ciclooxigenase 2 (COX2) e prostaglandina microssomal sintase 1 (mPGES1) nas células vasculares do cérebro, traduzindo os sinais inflamatórios em uma cascata de sinalização de prostaglandina (ENGBLOM et al., 2002 e 2003), que por sua vez ativam o metabolismo de noradrenalina e serotonina alterando o comportamento do animal induzindo apatia e comportamento ansiogênico, além de aumentar a secreção do Hormônio Liberador de Corticotrofina alterando o eixo HPA de tal maneira que a concentração plasmática do Hormônio Adenocorticotrófico (ACTH) e de glicocorticóides se elevam. (BESEDOVSKY et al., 1986; DUNN, 1988, 2000).

As regiões do sistema nervoso central responsáveis pelo padrão normal de ansiedade descritos na literatura são o hipocampo ventral, mas não o dorsal (BANNERMAN et al., 2004; KJELSTRUP et al., 2002) e região medial do córtex pré-frontal que, por sua vez, faz conexões com áreas do sistema límbico (VERTES, 2004). É possível que tais regiões possam sofrer influência de prostaglandinas produzidas pela exposição do organismo ao LPS.

A geração de prostaglandina parece ser fundamental para o estabelecimento do comportamento de apatia e queda da capacidade exploratória, pois inibidores de COX impedem que esse comportamento se estabeleça frente à exposição ao LPS (PAIVA et al., 2010).

Segundo Hauger, colaboradores (2009), Ohmura e Yoshioka (2009) o comportamento de ansiedade também é estabelecido de forma endócrina, pois a administração de LPS aumenta a secreção do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRF) (TURNBULL et al., 1998).

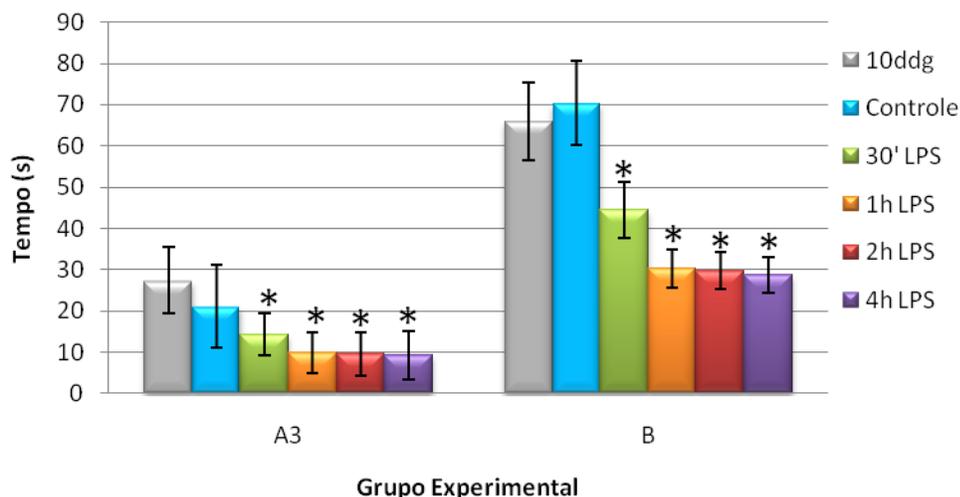
No teste de reconhecimento de objetos os animais passaram pelas etapas de *familiarização*, *teste* e *experimento*. Os resultados obtidos a partir da etapa de *teste* estão expressos no **Gráfico 5**, através da fórmula de *exploração global*, e os resultados obtidos na etapa de *experimento* estão expressos no **Gráfico 6**. A avaliação do teste de reconhecimento espontâneo de objetos é dada pela taxa de discriminação apresentada no **Gráfico 7**.



**Gráfico 5** - O gráfico demonstra as médias (segundos) obtidas a partir da soma da exploração dos dois objetos (A1 e A2) da etapa de teste apresentada pelos animais de cada grupo experimental. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

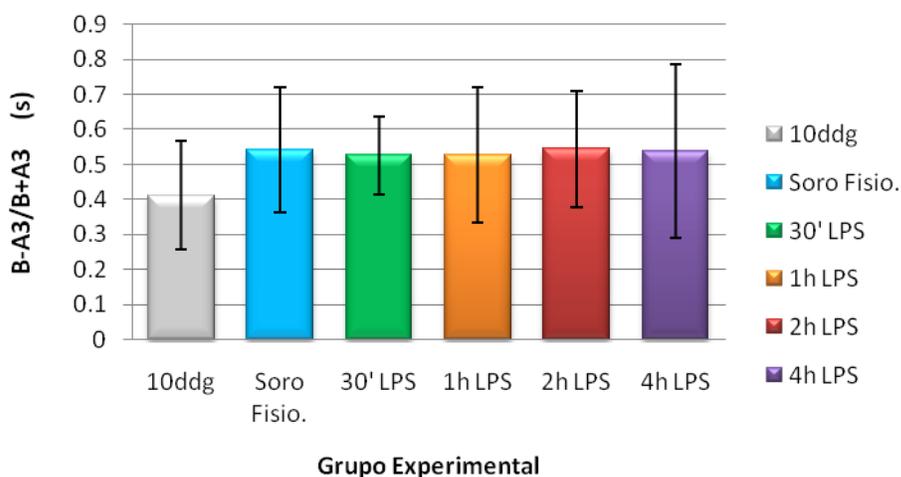
## Exploração dos objetos A3 e B



**Gráfico 6** - O gráfico demonstra as médias obtidas através do tempo de exploração (segundos) do objeto A3 e B apresentadas pelos animais de cada grupo experimental. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

## Taxa de Discriminação



**Gráfico 7** - O gráfico demonstra as médias obtidas através da razão entre a exploração do objeto novo (B) menos a exploração do objeto já conhecido (A3) e a exploração de B mais a exploração de A3 (segundos) apresentados pelos animais de cada grupo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Fonte – Do Autor.

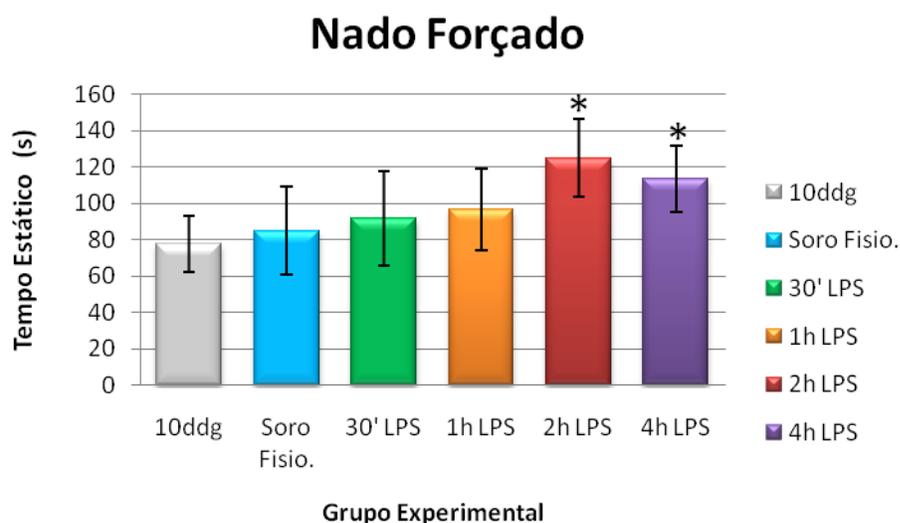
Em nosso estudo, foi possível identificar alterações comportamentais relacionadas à diminuição na capacidade de exploração global (A1 e A2) (**GRÁFICO 5**), além da diminuição da capacidade de exploração dos objetos A3 e B na etapa de *experimento* (**GRÁFICO 6**), identificando assim, comportamento de sonolência e apatia nesses animais, sendo estas alterações constituintes do comportamento doentio.

No entanto, foi possível observar que não existe diminuição da capacidade de reconhecimento de objetos à medida que o tempo de exposição ao LPS aumenta, ou seja, o tratamento não foi capaz de alterar a capacidade de retenção de memória em curto prazo em camundongos durante a prenhez (**GRÁFICO 7**).

Como descrito anteriormente, a apatia e diminuição na capacidade de exploração parecem ser dependentes de prostaglandina, uma vez que inibidores de COX impedem que esse comportamento se estabeleça frente à exposição ao LPS (PAIVA et al., 2010).

Estudos realizados por Barichello e colaboradores (2007) utilizaram ratos Wistar machos onde induziram a sepse pela perfuração e ligação cecal (CLP) e avaliaram o comportamento de memória de reconhecimento de objetos dos que sobreviveram à cirurgia. Em seus estudos, observaram que houve diminuição da capacidade de retenção de memória nestes animais. O experimento de reconhecimento espontâneo de objetos vem sendo utilizado como uma importante ferramenta de investigação dos efeitos de drogas sobre a memória de curto e longo prazo e, também, para investigar os mecanismos pelos quais esses efeitos acontecem (TANG et al., 1999; BAKER e KIM, 2002; ROSA et al., 2003). Portanto, segundo nossos resultados é possível que a prenhez em camundongos seja capaz de prevenir a perda de memória de curto prazo após sepse induzida por LPS. No entanto, cumpre salientar que a metodologia utilizada por Barichello e colaboradores (2007) não foi similar à desenvolvida neste trabalho, sendo que a sepse foi induzida por CLP e apenas 10 dias após a cirurgia os animais foram submetidos ao teste comportamental.

Outro comportamento identificado como componente do comportamento doentio que poderia estar alterado frente o tratamento é o depressivo. Como descrito anteriormente, os animais de cada grupo experimental foram submetidos ao teste do Nado Forçado para avaliar a ocorrência de possível comportamento depressivo.



**Gráfico 8** - O gráfico demonstra as médias do tempo (segundos) em que os animais permaneceram estáticos durante o teste do nado forçado. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

Os resultados obtidos através do teste do Nado Forçado possibilitaram a identificação do início do comportamento depressivo já esperado pela indução da inflamação por LPS. Após 2 horas da aplicação do LPS (**GRÁFICO 8**) ocorre um aumento abrupto no tempo em que os animais permanecem estáticos ( $p=0,002$ ). Tal resultado sugere que estes animais estejam apresentando um comportamento depressivo, e esta alteração confirma o estabelecimento do comportamento doentio.

O estado depressivo foi evidente a partir da segunda hora após o tratamento e persistiu até o último período avaliado. Os resultados sugerem um período de latência de 2 horas para que o comportamento depressivo se estabeleça no indivíduo, o mesmo tempo de latência (2 horas) também foi observado para o estado febril.

Alterações do sistema imunológico parecem preceder o desenvolvimento do estado depressivo (YIRMIYA, 1997; 1999), além disso, tal estado está relacionado com o aumento dos níveis séricos de citocinas, demonstrando a importância dessas moléculas na mediação das respostas emocionais e cognitivas frente à infecção.

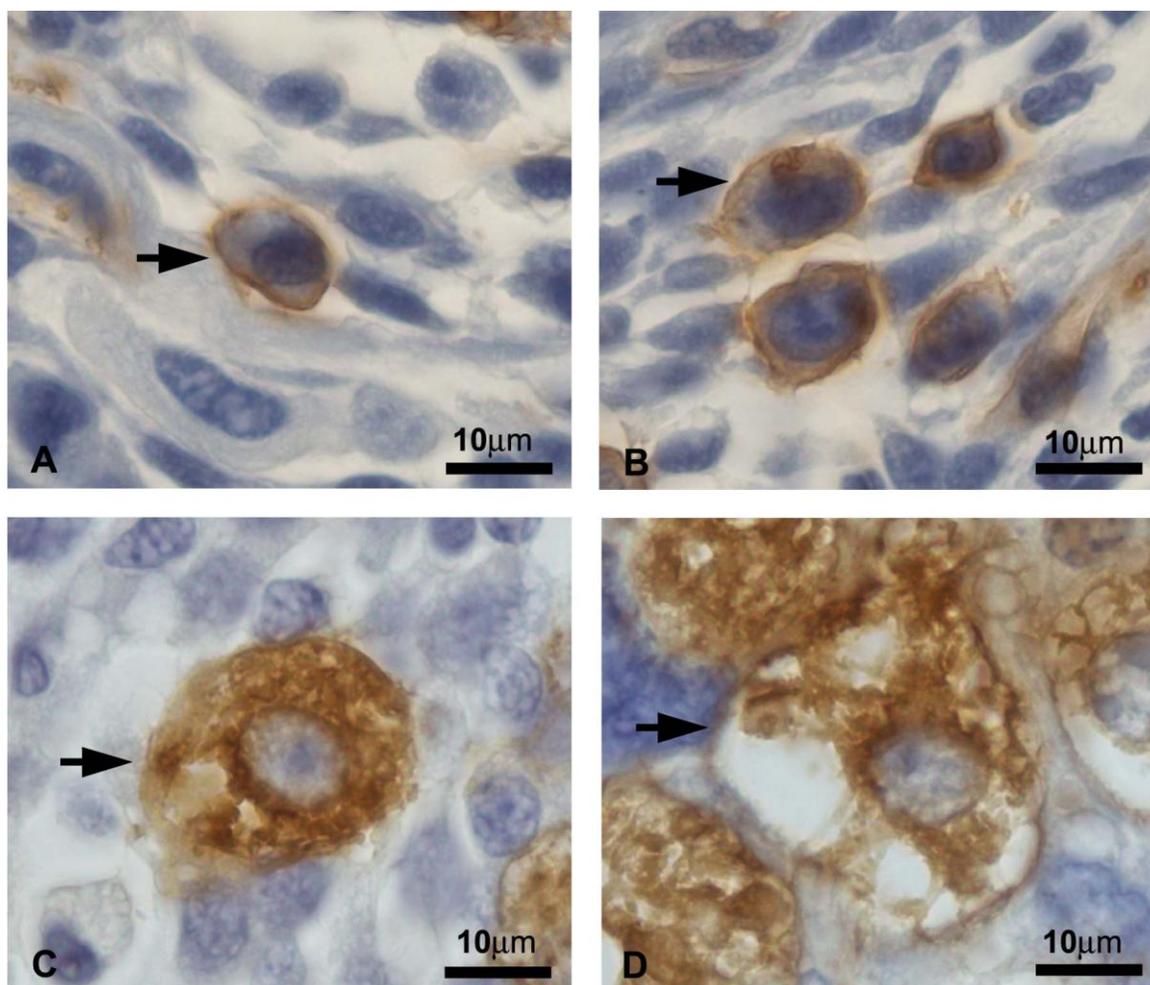
Nossos resultados corroboram aos encontrados por (PAIVA et al., 2010) que também encontraram significativo aumento do tempo que o animal ficou estático 2 horas após o tratamento com LPS. Nos estudos realizados por SWIERGIEL e DUNN (2007) também foi observado aumento no tempo que os animais tratados com LPS ficaram estáticos e sugeriram que os efeitos são similares aos obtidos pelos animais que foram tratados apenas com IL-1.

O modelo de inflamação por LPS parece ser de grande importância para estudos de depressão, apesar dos mecanismos pelos quais tal comportamento é gerado ainda não serem completamente compreendidos. Apesar disso, Paiva e colaboradores (2010) sugerem que a indução da depressão pela administração de LPS possa ser dependente do mecanismo das ciclooxigenases, uma vez que o uso de inibidores de COX diminuiu os efeitos gerados por esse tratamento.

Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de alterações comportamentais evidentes frente à inflamação induzida pelo Lipopolissacarídeo de *E.coli*. Tais comportamentos incluem a evolução de quadros de ansiedade após 1 hora do tratamento, e de quadro febril e depressivo após 2 horas, apesar de não alterarem a memória à curto prazo desses animais.

Estudos realizados por Croy e colaboradores (2005) demonstraram que a baixa dose de LPS pode alterar a expressão de iNOS, porém, não o suficiente para causar alterações morfológicas imediatas em útero prenhe de camundongos. Entretanto, já que o LPS é capaz de alterar a produção de citocinas pro-inflamatórias, bem como a expressão de moléculas de adesão (como selectinas) que favorecem a migração e a diapedese de células imunológicas, é esperado que ocorram alterações no número e na atividade das células *Natural Killer* uterinas.

A partir da análise morfológica dos cortes histológicos de sítio de implantação embrionária dos camundongos normais, bem como dos animais que receberam a injeção de LPS submetidos à citoquímica de lectina DBA, foi possível identificar os 4 subtipos das células *Natural Killer* uterinas caracterizados por Paffaro Jr e colaboradores (2003) **(FIGURA 5)**.



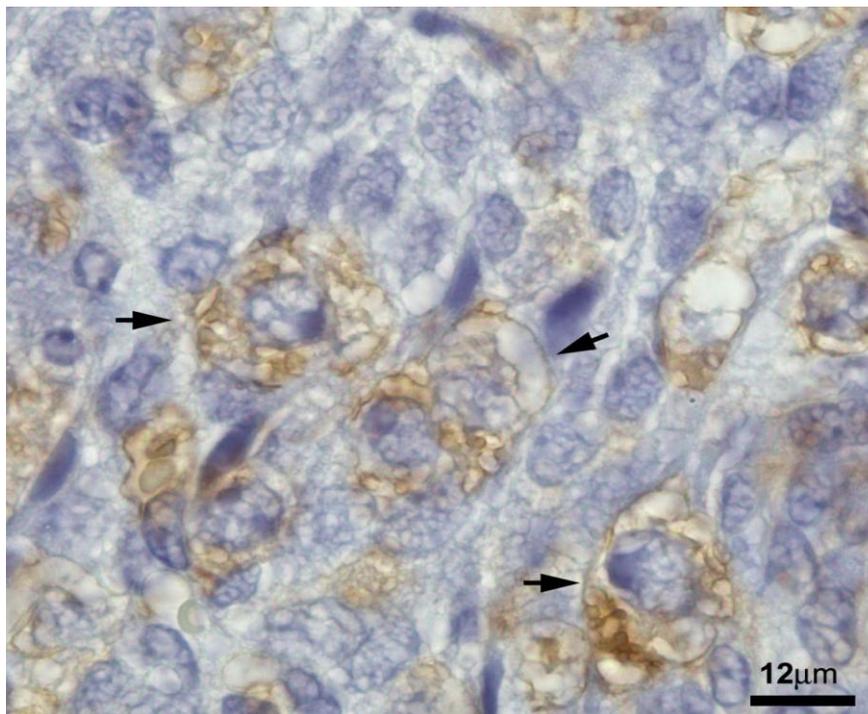
**Figura 5** - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos normais no 10<sup>o</sup> ddg mostrando células uNK (seta) do subtipo 1 (A), subtipo 2 (B), subtipo 3 (C) e subtipo 4 (D). Notar a reatividade para lectina DBA (coloração castanho) na membrana superfície e grânulos destas células. Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte – Do Autor.

Sendo assim, o subtipo 1 das células *Natural Killer* uterinas apresentava aspecto linfóide, sendo pequena em diâmetro, sem grânulos citoplasmáticos e com núcleo contendo predominantemente heterocromatina (**FIGURA 5A**). O subtipo 2 dessas células apresentava diâmetro maior do que a anterior e possuía grânulos citoplasmáticos (**FIGURA 5B**). O subtipo 3 era muito maior em diâmetro, apresentava muitos grânulos citoplasmáticos e núcleo predominantemente em eucromatina (**FIGURA 5C**). E finalmente o subtipo 4 representava o estágio de senescência dessas

células com conteúdo granular variável e grandes regiões lembrando extração citoplasmática (**FIGURA 5D**).

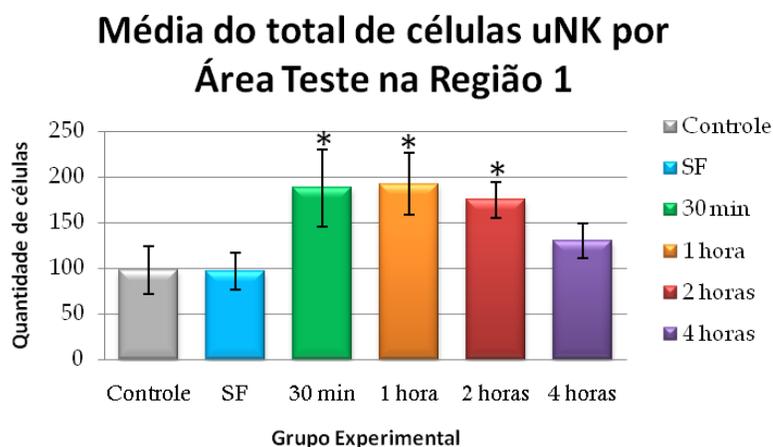
Adicionalmente, os animais que receberam injeção de LPS intraperitoneal exibiram células *Natural Killer* uterinas com alterações no padrão de reatividade para lectina DBA. Estas alterações impediram a classificação de um conjunto de células *uNK* nos padrões descritos para camundongos normais (PAFFARO JR et al., 2003) sendo, portanto, necessária a adição de um quinto subtipo de *uNK* denominado em nosso estudo de *uNKa* (célula *Natural Killer* uterina alterada). As *uNKa* apresentavam grânulos de aspecto vazio e/ou descontinuidade da reatividade para DBA em suas membranas e/ou ausência de reatividade para DBA em seus grânulos (**FIGURA 6**), a exemplo do que foi descrito por Lippe (2007) após 6 horas da administração de LPS e que revelaram que estas alterações são semelhantes àsquelas observadas no estudo das *uNK* após lesão embrionária em camundongos (ROMAN, 2001).



**Figura 6** - Fotomicrografia de corte histológico de sítio de implantação de camundongo no 10<sup>o</sup> ddg tratado com LPS. Notar os tipos de alterações no padrão de reatividade para lectina DBA nas *uNKa* (setas). Observar grânulos de aspecto vazio, descontinuidade na reatividade para DBA na membrana e ausência de reatividade dos grânulos citoplasmáticos. Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte – Do Autor.

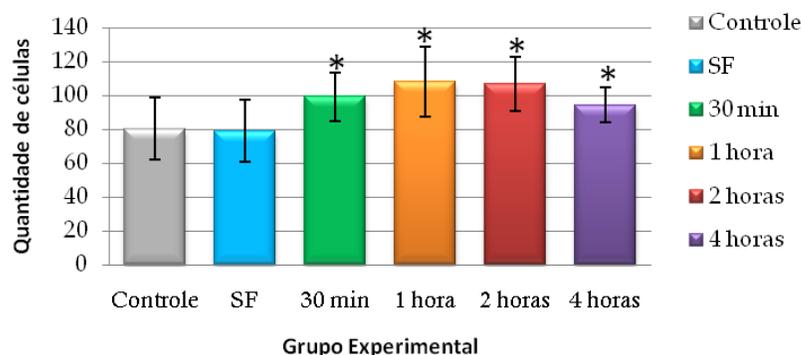
Nossos estudos estereológicos demonstraram inicialmente que em todas as áreas analisadas o número total de células *uNK* nos sítios de implantação aumentou significativamente após 30 minutos da injeção de LPS, este número se manteve após 1 hora e 2 horas do LPS e diminuiu chegando à valores próximos do controle após 4 horas nas regiões 1 e 3, porém não diminuiu na região 2 (**GRÁFICO 9, 10 e 11**). Estes resultados demonstraram que o LPS injetado intraperitonealmente foi capaz de alterar rapidamente o número de células *uNK* nos sítios de implantação embrionária, a exemplo do que foi demonstrado por Schmitz e colaboradores (2007) após 2 horas da injeção da mesma dose de LPS, porém, a administração foi feita dentro do útero em camundongos prenhes no 15º ddg causando intenso parto prematuro (75%). O não restabelecimento do número de *uNK* após 4 horas exclusivamente na região 2 pode ser explicado visto que a região dois, observada em nossos estudos, foi caracterizada em camundongos normais como um área de intensa proliferação de *uNK* em estudos anteriores (PAFFARO JR et al., 2008).



**Gráfico 9** - Análise estereológica mostrando o número total de células *uNK* na região 1 de sítios de implantação de camundongos no 10º ddg normais e tratados com LPS. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.

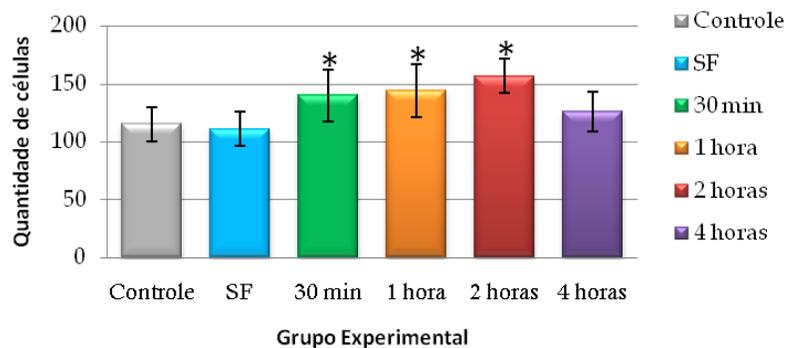
### Média do total de células uNK por Área Teste na Região 2



**Gráfico 10** - Análise estereológica mostrando o número total de células uNK na região 2 de sítios de implantação de camundongos no 10º ddg normais e tratados com LPS. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

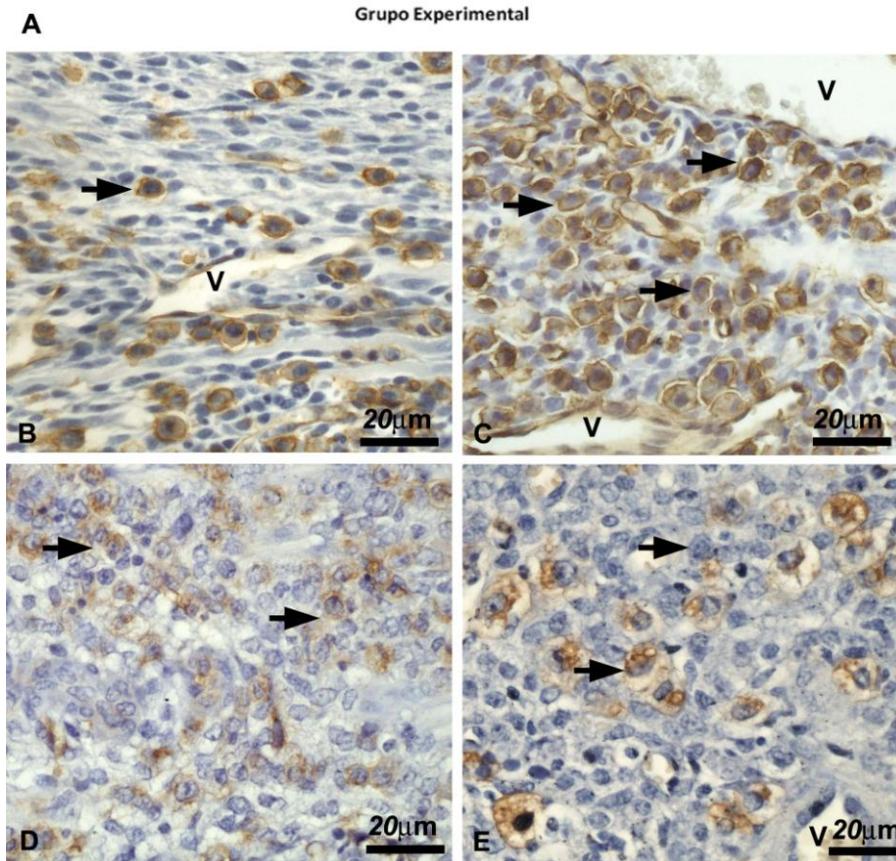
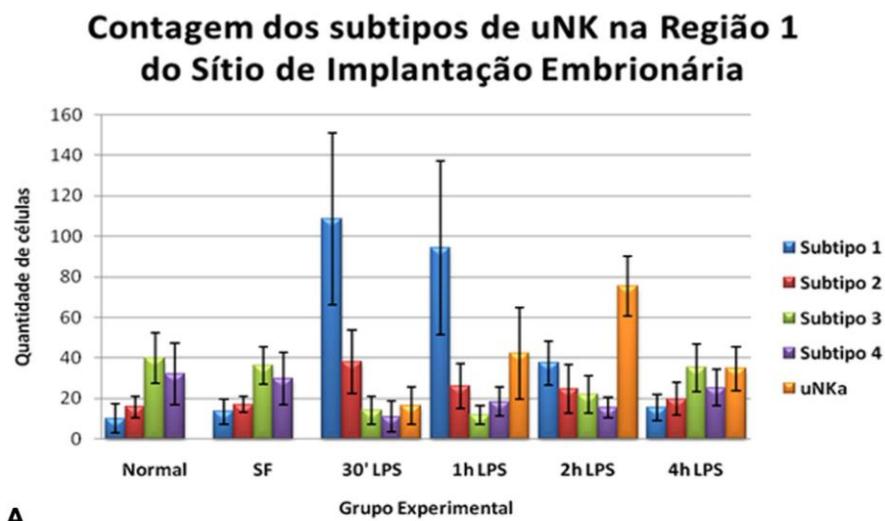
Fonte – Do Autor.

### Média do total de células uNK por Área Teste na Região 3



**Gráfico 11** - Análise estereológica mostrando o número total de células uNK na região 3 de sítios de implantação de camundongos no 10º ddg normais e tratados com LPS. (\*) Indica ocorrência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle.

Fonte – Do Autor.



**Figura 7** - Análise estereológica da Região 1 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados (A). Observar aumento na quantidade de células uNK imaturas (sibtipo1) no útero de camundongos após 1 hora da injeção de LPS (C) comparados com o grupo controle (B) para essa região. Após 2 horas do tratamento foi possível observar grande quantidade de células uNKa (D), porém, após 4 horas (E) a reatividade para lectina DBA começou a se restabelecer.

Fonte – Do Autor.

Quando procedida a análise quantitativa dos 4 subtipos de *uNK* por região, foi possível notar que na região do miométrio e endométrio próximo ao miométrio da região mesomentrial, região 1, **(FIGURA 7)**, existiu um aumento significativo das células *uNK* imaturas correspondentes ao subtipo1 após 30 minutos (108/AT) da aplicação de LPS em relação aos controles (10/AT) **(FIGURAS 7A, 7B)** e o número elevado deste subtipo se manteve após 1 hora do tratamento (94/AT) **(FIGURA 7A e 7C)**. Em 2 horas após LPS, o número de *uNK* do subtipo1 (37/AT) diminuiu em relação ao momento anteriormente analisado, mas continuou elevado quando comparado com os animais normais **(FIGURA 7A)**. O número deste subtipo de *uNK* continuou diminuindo até 4 horas da aplicação do LPS (16/AT) no entanto, continuava maior quando comparado aos animais normais **(FIGURA 7A)**.

Nesta região não foram notadas diferenças significativas entre os animais normais e tratados com soro fisiológico (13/AT) **(FIGURA 7A)**.

Concomitantemente ao aumento em número das células do subtipo 1, foi observado o aumento do subtipo 2 destas células na região 1 após 30 minutos da aplicação de LPS (38/AT) e este se manteve elevado após 1 hora (26/AT) comparado com os animais normais (15/AT) **(FIGURA 7A)**. O número de células *Natural Killer* uterinas do subtipo 2 nesta região continuou aumentado após duas (24/AT) e quatro horas (19/AT) de tratamento.

O grande aumento de células *uNK* imaturas nesta região, sobretudo do subtipo 1, após o tratamento com LPS, sugere que o LPS induziu a migração de precursores de *uNK* para o útero. Estes resultados vão de encontro aos achados por Paffaro Jr e colaboradores (2003) que mostraram que a região 1 é a região de chegada das células *uNK*, fato esse que ocorre por volta do 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> ddg em camundongos normais.

Na região 1, a quantificação revelou adicionalmente que após os primeiros 30 minutos da aplicação do LPS ocorreu uma queda em número de células do subtipo 3 (14/AT) **(FIGURA 7A)** essa contagem foi semelhante ao observado em 1h após o tratamento (12/AT). Após 2 horas esse subtipo ainda foi observado em menor número (22/AT) comparado com o normal (40/AT), mas aumentou após 4 horas (35/AT) alcançando os níveis normais esperados para esse dia de gestação observado em

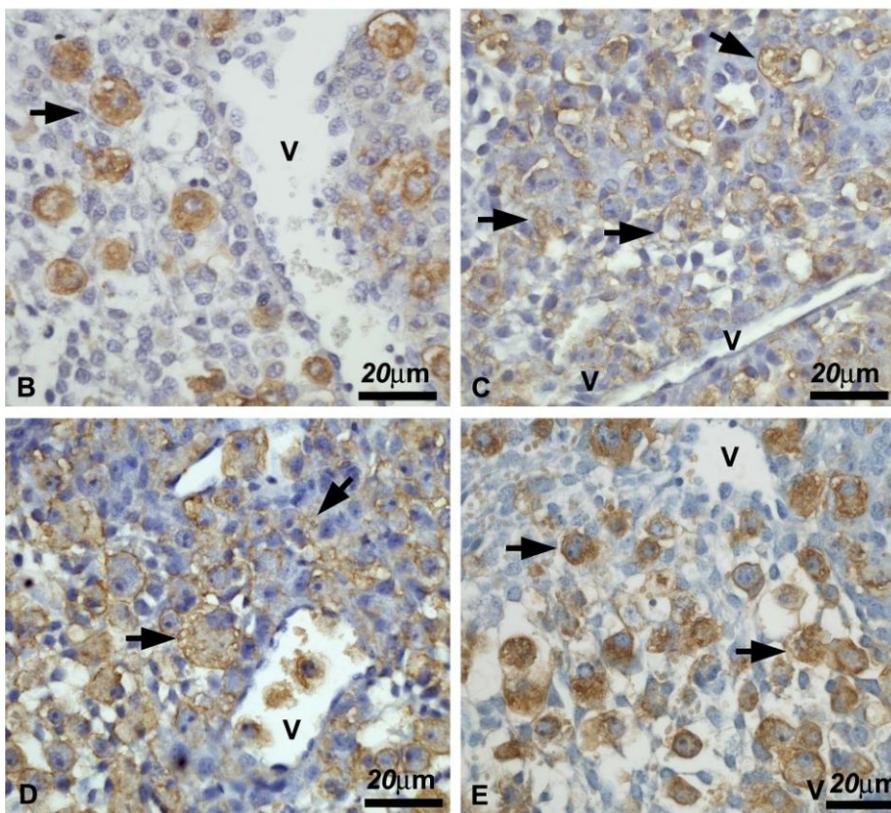
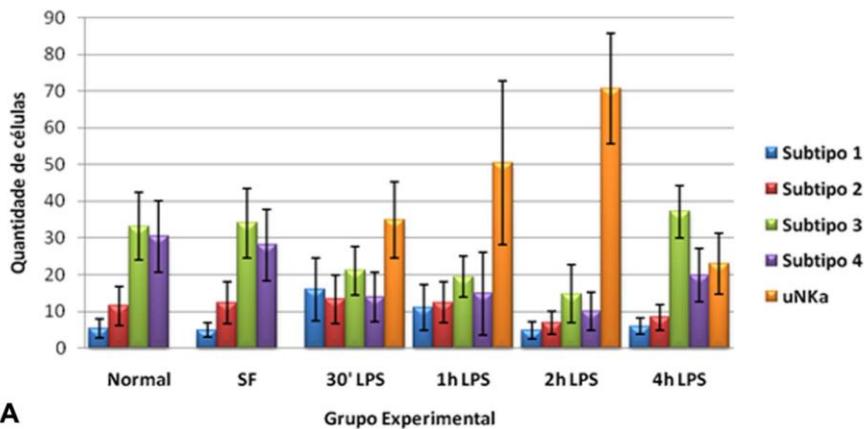
animais controle. Em relação ao subtipo 3, os animais tratados com salina (36/AT) também não apresentaram diferença significativa quando comparado com o grupo controle.

O subtipo senescente (subtipo 4), por sua vez, foi encontrado em menor número após 30 minutos do LPS (11/AT) (**FIGURA 7A**), aumentou após 1 hora do tratamento (18/AT), mas se manteve reduzido comparado com o controle (32/AT). Com 2 horas após o tratamento a contagem revelou que o subtipo 4 (15/AT) ainda era menor do que o controle, mas alcançou a quantidade observada em camundongos normais após 4 horas (25/AT).

Na região 01, foi observado o surgimento de células *uNKa* logo após o tratamento com LPS, ou seja, no período de 30 minutos após a administração do mesmo (16/AT) (**FIGURA 7A**). Essa quantidade aumentou significativamente no período de 1 hora (42/AT) e 2 horas (75/AT) (**FIGURA 7D**), mas diminuiu no período de 4 horas após o tratamento (**FIGURA 7E**).

Em uma região intermediária entre o miométrio e o endométrio decidualizado próximo ao embrião, região 2, (**FIGURA 7**) foi possível notar que o subtipo 1 de *uNK* aumentou em número após os primeiros 30 minutos (16/AT) e 1 hora (11/AT) da aplicação de LPS, mas sua densidade voltou para níveis comparados ao normal (5/AT) nos períodos subsequentes de tratamento.

### Contagem dos subtipos de uNK na Região 2 dos Sítios de Implantação Embrionária



**Figura 8** - Análise estereológica da Região 2 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados (A). Observar aumento na quantidade de células uNKa no útero de camundongos após 30 minutos da injeção de LPS (C) comparados com o grupo controle (B) para essa região. Após 2 horas do tratamento número de células uNKa aumentou (D), porém, após 4 horas (E) a reatividade para lectina DBA começou a se restabelecer.

Fonte – Do Autor.

No que diz respeito ao número de *uNK* do subtipo 2, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas até o período de 1 hora após o LPS (12/AT). No entanto, após 2 horas houve diminuição deste subtipo (6/AT), seguido de um aumento em número após 4 horas (9/AT), número este próximo ao observado em animais do grupo controle (11/AT).

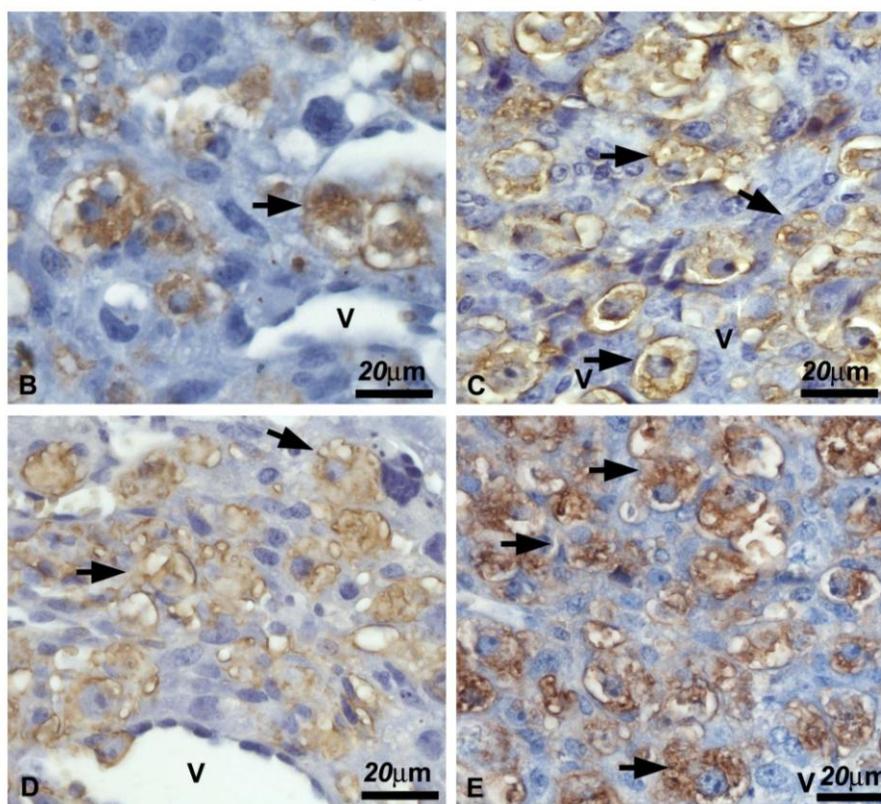
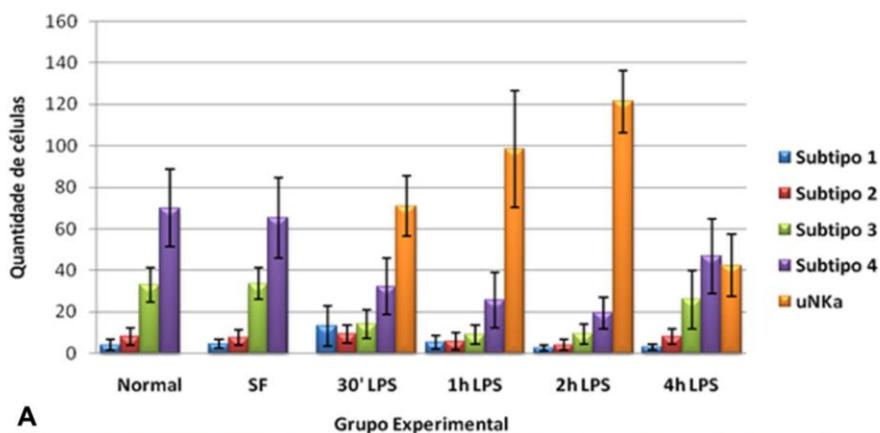
Na mesma região, a quantificação das *uNK* nos primeiros 30 minutos após LPS demonstrou redução do subtipo 3 de *uNK* (21/AT) comparado com o normal (33/AT) (**FIGURA 8A, 8B, 8C**), bem como o observado após 1 hora (19/AT) e 2 horas (15/AT) (**FIGURA 8D**) após esse tratamento. Ao atingir a quarta hora após LPS, o número de células *uNK* do subtipo 3 parecia se restabelecer (37/AT) (**FIGURA 8E**).

O Subtipo 4 se manteve reduzido nesta região após o LPS, apesar de apresentar discreto aumento entre os períodos de 2 horas (10/AT) e 4 horas (20/AT).

À exemplo do observado na região 1, na região 2 as células *uNK*<sub>a</sub> foram notadas a partir de 30 minutos após o LPS (**FIGURA 8A, 8B, 8C**), e aumentaram expressivamente até 2 horas (**FIGURA 8D**) (70/AT), seguido de sua posterior redução após a quarta hora (**FIGURA 8E**) (23/AT). A administração de soro fisiológico não alterou a quantidade das células *uNK* nessa região.

Na região 3, localizada na porção do endométrio mais próxima ao embrião em desenvolvimento (**FIGURA 9**), foi possível notar pequeno aumento do subtipo 1 de *uNK* após 30 minutos de LPS (13/AT). No entanto, estas células foram observadas em número reduzido até o período de 4 horas nesta região (**FIGURA 9A**). As células do subtipo 2 também se mantiveram em quantidade pequena durante todo o tratamento, semelhante ao observado em animais controle (8/AT) (**FIGURA 9A**).

### Contagem dos subtipos de uNK na Região 3 dos Sítios de Implantação Embrionária



**Figura 9** - Análise estereológica da Região 3 dos sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados (A). Observar aumento na quantidade de células uNKa no útero de camundongos após 30 minutos da injeção de LPS (C) comparados com o grupo controle (B) para essa região. Após 2 horas do tratamento número de células uNKa aumentou (D), porém, após 4 horas (E) a reatividade para lectina DBA ficou mais próxima ao observado no grupo controle (B).

Fonte – Do Autor.

O subtipo 3, nesta região estava reduzido em número após 30 minutos de LPS (14/AT) e se manteve baixo até 2 horas (9/AT), mas aumentou após 4 horas (26/AT), alcançando média semelhante à observada para o grupo normal (32/AT).

A incidência do subtipo 4 na mesma região foi semelhante àquela observada para o subtipo 3, sendo que estas células diminuíram em número nos primeiros 30 minutos (32/AT), mantiveram-se em número reduzido até 2 horas (20/AT) e aumentaram somente após 4 horas do tratamento com LPS (47/AT), sem, contudo, alcançar o número médio observado em animais controle (70/AT).

À semelhança do observado nas regiões 1 e 2, na região 3, foi notado o aparecimento de células *uNKa* a partir do período de 30 minutos após o LPS (71/AT) (**FIGURA 9A, 9B e 9C**). O número destas células *uNKa* aumentou ainda mais até o período de 2 horas após LPS (121/AT) (**FIGURA 9A e 9D**). Interessantemente, o aparecimento e aumento em número de células *uNKa* foi concomitante à diminuição do número de células *uNK* do subtipo 3 e 4 em todas as regiões analisadas (**FIGURA 7, 8 e 9**), sugerindo que as células *uNK* do subtipo 3 e 4 (mais diferenciadas) são as principais células alteradas e provavelmente responsivas ao estímulo do LPS injetado intraperitonealmente em camundongos prenhes. Além disso, foi possível constatar nas regiões 2 e 3 o aumento no número de células *uNK* dos subtipos 3 e 4 simultâneo a diminuição da incidências de células *uNKa* no período de 4 horas após LPS. Este dado sugere fortemente que existiu restabelecimento na expressão do açúcar N-acetil-Galactosamina nos grânulos e superfície de células *uNK*, causando conseqüentemente restauração no padrão de reatividade para lectina DBA nestas células.

Murphy e colaboradores (2005) administraram LPS em camundongos normais e camundongos *IL10<sup>-/-</sup>* no 6º ddg e, ao avaliarem os sítios de implantação embrionária no 12º ddg, afirmaram que a gestação não estava comprometida no primeiro grupo, mas sim nos camundongos *IL10<sup>-/-</sup>*, ressaltando a grande importância da Interleucina 10 na regulação da inflamação em longo prazo. Além disso, afirmaram que ocorreu pequeno aumento da citotoxicidade das células *uNK* mesmo nos camundongos normais após o tratamento com LPS. No entanto, em seus estudos não foram avaliadas as alterações imediatas em função da aplicação do LPS.

Nossos resultados demonstram que, em um primeiro momento, ou seja, até 1 hora após a administração de LPS, houve aumento de células *uNK* imaturas (subtipo 1 e 2) na região 1, acompanhado pelo surgimento de células *uNK* alteradas nesta mesma região. Este pode ser um resultado ocorrido em função do aumento de citocinas pró-inflamatórias no ambiente uterino, provocando o influxo de *uNK* jovens e ativação das *uNK* maduras. Além disso, alguns trabalhos demonstram que o LPS induz expressão em macrófagos de várias quimiocinas (KOPYDLOWSKI et al., 1999) que podem estar envolvidas nesse processo.

O fato de ocorrer o aumento expressivo de células *uNK* imaturas na região 1 e não tão expressivo na região 2, sugere que o aumento dessas células se deve ao influxo e não à proliferação, já que a região 1 foi caracterizada por Paffaro Jr e colaboradores (2003) como sendo a região de influxo e a 2 de proliferação de *uNK*. Além disso, não foram observadas muitas células em mitose na região 1 em relação à região 2 em nossos estudos.

Estudos *in-vitro* utilizando células mononucleares periféricas em cultura demonstraram que o tratamento com LPS induziu proliferação e ativação da citotoxicidade das células *NK* periféricas (GOODIER; LONDEI, 2000; MIRANDA et al., 1998). No entanto, para que isso ocorra parece ser necessária a presença de células dendríticas (GOODIER; LONDEI, 2000) possivelmente por mediar a ativação das células *NK* por liberarem citocinas estimulatórias.

O Lipopolissacarídeo parece estimular a expressão de IL-12 em células trofoblásticas (ABRAHAMS et al., 2004), além de estimular a expressão de IL-12 e IL-18 em macrófagos (D'ANDREA et al., 1992; OKAMURA et al., 1995). Wang e colaboradores (2007) demonstraram que o Hormônio Liberador de Corticotrofina, que se encontra em níveis aumentados durante a sepse, é capaz de aumentar a sensibilidade das células trofoblásticas no reconhecimento de endotoxinas por aumentarem a expressão de *TLR4* nessas células, que passam a liberar grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-8, que somados à IL-12, IL-18 e outras citocinas podem participar da ativação da citotoxicidade das células *uNK*.

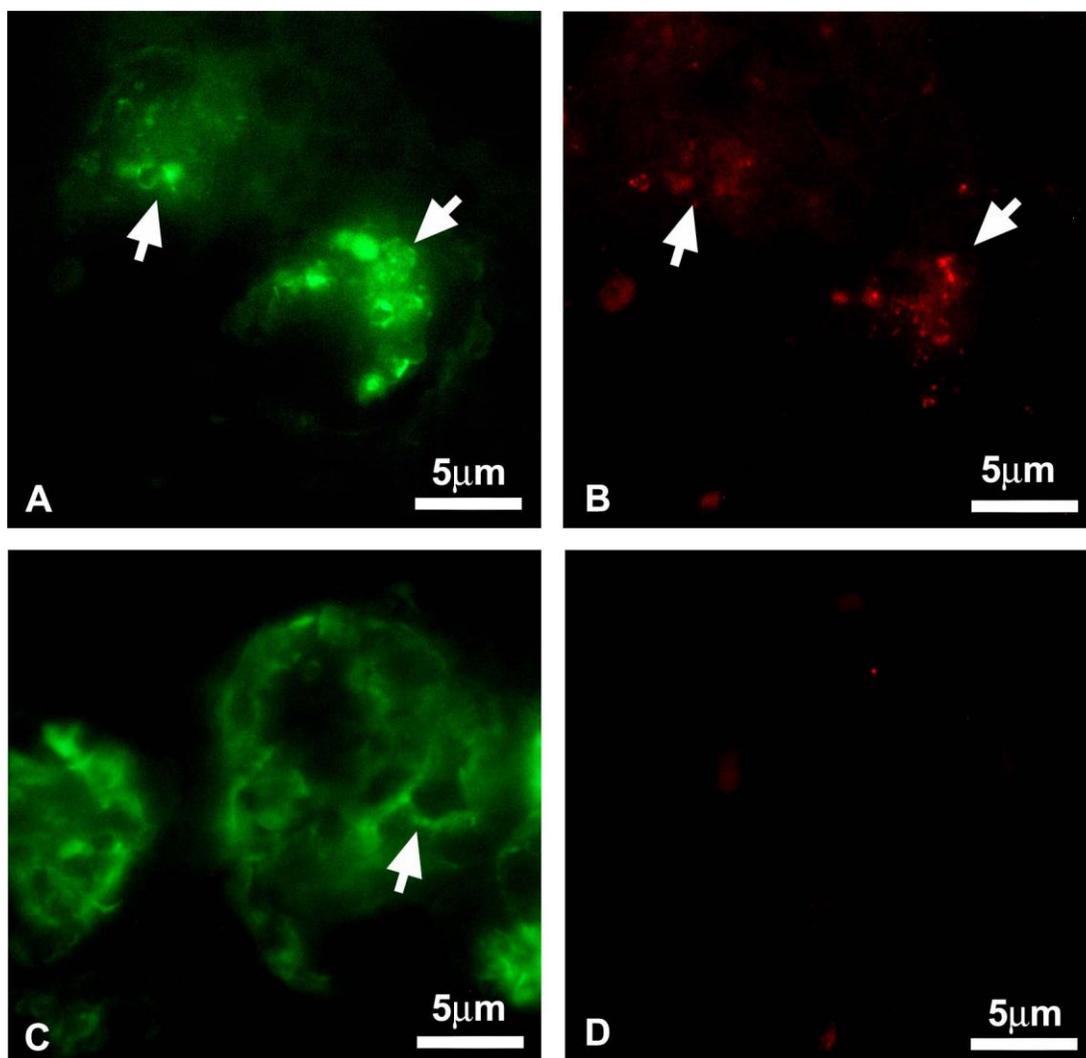
No presente trabalho, foi bastante expressivo o aumento de células *uNK* após a aplicação de LPS até a segunda hora deste tratamento nas 3 regiões dos sítios de

implantação embrionária estudados. Concomitante a este evento ocorreu a diminuição de *uNK* do subtipo 3 e 4, o que sugere que as principais células alteradas pelo LPS sejam as células maduras e senescentes.

Como foram observadas célula *uNK* que apresentavam grânulos vazios ou ausência de marcação nos grânulos citoplasmáticos após o tratamento com LPS, é plausível supor que estas alterações sejam indicativos de degranulação e ativação da citotoxicidade de *uNK*.

Nossos resultados revelaram que após 4 horas da aplicação do LPS o número de células *uNKa* estava diminuído quando comparado com os períodos pós-tratamento anteriores. Esta diminuição foi concomitante ao aumento em número de células *uNK* do subtipo 3 e 4. Estes resultados sugerem um provável restabelecimento da morfologia das *uNK* com recuperação na expressão de glicoconjugados contendo N-acetilgalactosamina na superfície e grânulos das *uNK* após 4 horas de tratamento. Um dos fatores que podem atuar para esta recuperação, bem como, para o restabelecimento da homeostasia uterina após injeção de LPS é a expressão de IL-10 inibindo a produção das citocinas que ativam a citotoxicidade das *uNK*. Murphy e colaboradores (2005) demonstraram que a administração de IL-10 e anti-TNF- $\alpha$  revertem os casos de perda gestacional em camundongos tratados com LPS, bem como a quantidade e a atividade citotóxica das células *uNK*.

Para avaliar se existia alteração no conteúdo de perforina dos grânulos citoplasmáticos das células *Natural Killer* uterinas frente ao tratamento com LPS, as lâminas histológicas dos sítios de implantação embrionária coletados foram submetidas à técnica de dupla marcação de citoquímica para Lectina DBA e imunocitoquímica para perforina (**FIGURA 10**).



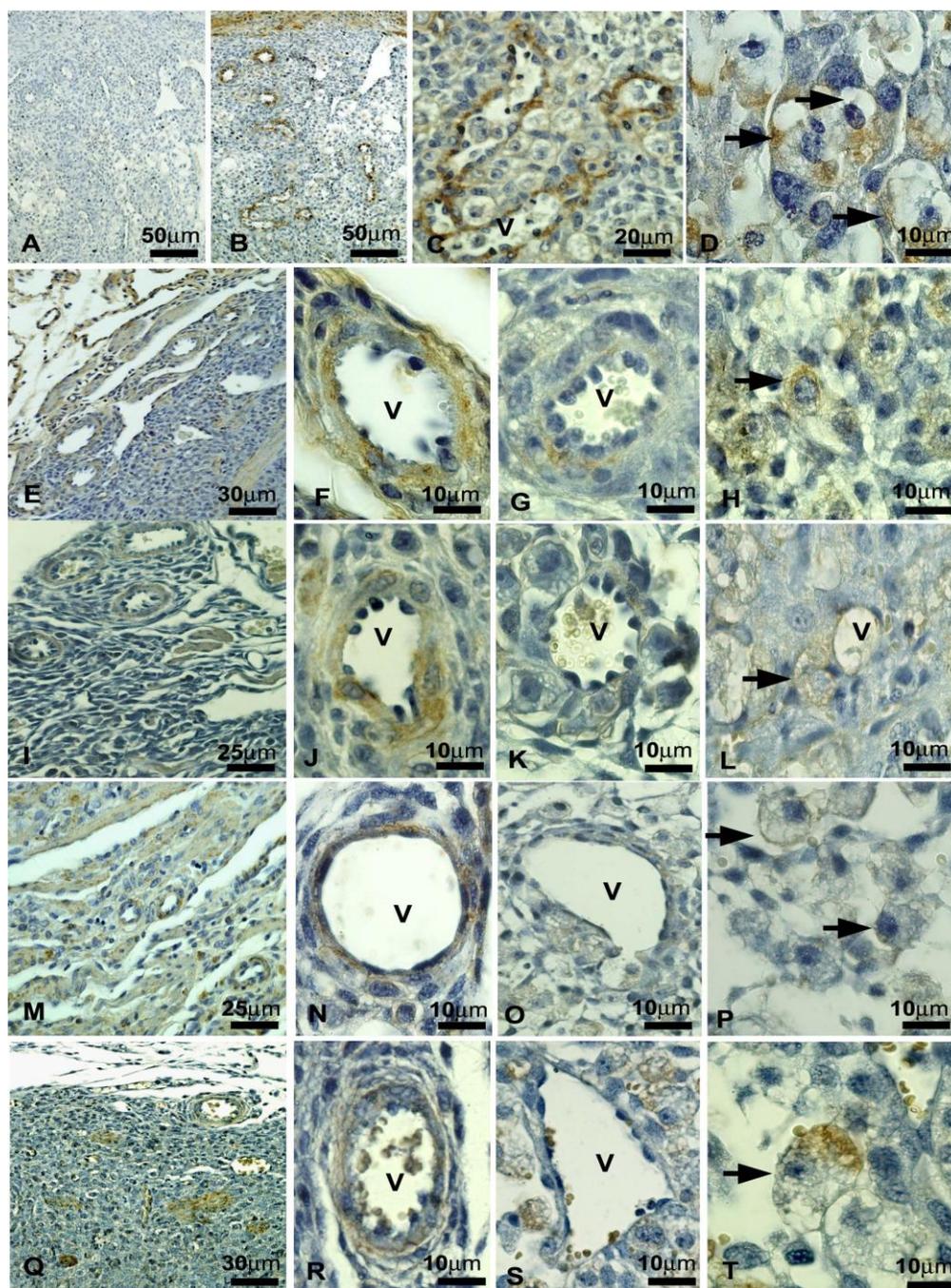
**Figura 10** - Fotomicrografias de cortes Histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10<sup>o</sup> ddg submetidos a dupla marcação de citoquímica de lectina DBA + imunocitoquímica para perforina. Notar em animais normais (A e B) os grânulos das células uNK positivos para lectina DBA (setas) e para perforina (cabeças de seta). Observar os grânulos reativos para lectina DBA de aspecto vazio (C) e não reativos para perforina (D) em animais após 1 hora de LPS. Lectina DBA-FITC (verde). Perforina-Cy3 (vermelho).

Fonte – Do Autor.

Por meio do estudo citoquímico e imunocitoquímico de dupla marcação foi possível identificar a reação positiva para lectina DBA nos grânulos e superfície das células *uNK* uterinas (**FIGURA 10A**) nos mesmos grânulos positivos para perforina (**FIGURA 10B**) em animais normais do 10<sup>o</sup> ddg. Contudo, em camundongos a partir de

uma hora após o tratamento com LPS, muitas células *uNK* apresentavam diferença no padrão de reatividade para lectina DBA (**FIGURA 10C**). Adicionalmente foi constatado que os grânulos destas células não reagiram com o anticorpo anti-perforina (**FIGURA 10D**). Estes resultados demonstraram a queda brusca de perforina nos grânulos das *uNK* após a injeção de LPS e são indicativos da rápida ocorrência de citotoxicidade destas células em situação de sepse, o que corrobora os dados de Murphy e colaboradores (2005), que injetaram LPS intra-uterinamente em camundongos durante a gestação.

Os efeitos de endotoxinas sobre a circulação estão bastante estabelecidos na literatura, como por exemplo, o efeito na redução da resistência vascular que leva à queda da pressão arterial. Particularmente durante a gestação, ocorre diminuição da resistência vascular periférica (por influência de mediadores como prostaciclina, óxido nítrico e hormônios gestacionais) e aumento da frequência cardíaca, com conseqüente queda da pressão arterial e aumento do débito cardíaco. Neste sentido, a sepse na gestação poderia causar diversos problemas para o desenvolvimento do feto em função da baixa perfusão do ambiente uterino. Para avaliar a influência da administração de LPS durante a gestação no que diz respeito à organização de filamentos contráteis dos vasos do ambiente uterino e das células *uNK*, as lâminas histológicas dos sítios de implantação embrionária coletados foram submetidas a técnicas de imunocitoquímica utilizando anticorpo primário para  $\alpha$ -Actina (**FIGURA 11**).



**Figura 11** -.Fotomicrografias de cortes histológicos de SIE no 10<sup>o</sup>ddg. Pode-se observar o controle negativo (A) e reação positiva (B) da imunocitoquímica para  $\alpha$ -actina, além do detalhe de “B” mostrando reatividade nos vasos (C) e em células com morfologia semelhante à uNK (D). Após 30 minutos (E-H), 1 hora (I-L) e 2 horas (M-P) da injeção de LPS foi possível observar redução da reatividade para  $\alpha$ -actina no miométrio, vaso do miométrio, vaso do endométrio e células com morfologia semelhante à uNK respectivamente. Na quarta hora após o tratamento (Q -T) foi notado restabelecimento da reatividade nestas células (S e T).  $\alpha$ -actina/Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte – Do Autor.

Em camundongos normais por meio da imunocitoquímica, diferente dos controles negativos para a reação (**FIGURA 11A**), foi observada reação positiva para  $\alpha$ -actina nas células musculares lisas do miométrio, na camada muscular de vasos sanguíneos encontrados tanto no miométrio quanto no endométrio da região mesometrial (**FIGURA 11B, 11C**), bem como, em células de morfologia semelhante às células *Natural Killer* uterinas (**FIGURA 11D**). Interessantemente, a reação positiva para  $\alpha$ -actina foi encontrada polarizada nas células *uNK* e voltada para a direção do embrião implantado. Tais resultados sugerem a existência da polarização de  $\alpha$ -actina em determinadas regiões das células *uNK* para provável montagem de contatos focais para migração em direção a região 3, próxima do embrião implantado, o que corrobora os achados na literatura que sugeriram que as *uNK* de camundongos migram de áreas mais distantes do embrião para próximo deste (PAFFARO JR et al., 2003) sobre um substrato rico em fibronectina (ZAVAN et al., 2010) durante a gestação.

Passados 30 minutos da administração de LPS, continuou sendo observada a expressão de  $\alpha$ -actina nas células musculares lisas e vasos do miométrio (**FIGURA 11E e 11F**). No entanto, a reação para  $\alpha$ -actina era fraca nos vasos do endométrio e nas células dessa região (**FIGURA 11G, 11H**), em comparação com o observado no útero de camundongos normais.

A reação positiva para  $\alpha$ -actina continuou sendo observada no período de 1 hora após LPS no miométrio (células musculares lisas e vasos) (**FIGURA 11I e 11J**), e neste período de tratamento os vasos do endométrio não apresentavam reatividade para o anticorpo anti- $\alpha$ -actina (**FIGURA 11K**) e redução substancial na expressão desta molécula foi observada nas células de morfologia semelhante às células *uNK* (**FIGURA 11L**). Apesar de mais fraca, continuou a ser observada a reação positiva nos vasos e células musculares lisas do miométrio no período de 2 horas (**FIGURA 11M, 11N**) e 4 horas após inoculação do LPS (**FIGURA 11Q e 11R**). Os vasos do endométrio da região mesometrial não reagiram para o anti- $\alpha$ -actina no período de 2 horas (**FIGURA 11O**) e 4 horas (**FIGURAS 11S**) após LPS e as células observadas não reagiram para este anticorpo no período de 2 horas (**FIGURA 11P**), mas voltaram a apresentar reatividade no período de 4 horas (**FIGURA 11S e 11T**).

Estes resultados são contrários aos obtidos por Monk e colaboradores (2004), que sugeriram que baixas doses de LPS não alteram o diâmetro de vasos sanguíneos na região mesometrial de cortes histológicos de sítio de implantação embrionária corados com Hematoxilina e Eosina. No entanto, estes autores não realizaram estudos a respeito da expressão de  $\alpha$ -actina nesses vasos.

Células musculares lisas de vasos sanguíneos possuem elevada quantidade de proteínas contráteis, como  $\alpha$ -actina, que são afetadas por mediadores locais como a endotelina-1 e TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth factor  $\beta$ 1) (FISHER et al., 1997). É sabido que o Lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas medeia a ativação de vasodilatadores, alterando a ação contrátil da musculatura lisa pelo aumento da expressão de óxido nítrico sintase (LIU et al., 1997) e prostaglandinas (SCHILDKNECHT et al., 2004). Além disso, células musculares lisas de vasos sanguíneos expressam *TLR4* e *CD14* que são capazes de sinalizar até mesmo com baixas quantidades de LPS na circulação, resultando na diminuição da expressão de genes cujos produtos estão relacionados à contração, como o gene da  $\alpha$ -actina (SANDBO et al., 2007). Portanto, nossos resultados sugerem que após tratamento com LPS ocorre a desorganização dos filamentos contráteis dos vasos (principalmente das regiões 2 e 3 localizadas no endométrio da região mesometrial) do útero de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de LPS, até o período de 4 horas após o tratamento. Esta desorganização pode estar relacionada tanto com a despolimerização destes filamentos quanto com o impedimento da re-polimerização dos mesmos, como mecanismo de relaxamento dos vasos sanguíneos que pode levar ao aumento no aporte sanguíneo para nutrição da decídua e do embrião durante a sepse em camundongos prenhes.

Interessantemente, após tratamento com LPS foi diagnosticada diminuição até perda total da reatividade para  $\alpha$ -actina em regiões polarizadas das células de morfologia semelhante às *uNK*. As células *uNK* são conhecidas por sua capacidade de migração sobre um substrato rico em fibronectina, tanto em cultura (CROY; KISO, 1993) quanto in vivo (ZAVAN et al., 2010). A diminuição da reatividade para  $\alpha$ -actina nas células *uNK* após o LPS, sugere que ocorra desmontagem de contatos focais nestas células impedindo sua migração em um momento onde estas células podem ter

seu metabolismo voltado para responderem ao agente infeccioso por meio da ativação de sua citotoxicidade. No entanto, não existem dados na literatura a respeito da expressão de  $\alpha$ -actina em células *cNK* ou *uNK* durante a citotoxicidade.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível observar que a administração da endotoxina de *E.coli* causou, no organismo materno, alterações comportamentais e imunológicas que tiveram a finalidade de reduzir os efeitos do estressor visando a homeostasia, o que deve ocorrer não apenas para proteger a si próprio, mas também para reduzir os efeitos do LPS sobre a gestação destes animais.

O organismo materno identifica a presença da endotoxina através da ligação do LPS com os receptores *TLR4* e traduz para o sistema nervoso, endócrino e imunológico através de respostas celulares envolvendo a produção de citocinas e interleucinas. Esses sistemas, então, devem atuar de forma integrada para restabelecer a homeostasia (MIYAKE, 2004; JANEWAY et al., 2007).

A comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico ocorre pelo intermédio de hormônios, como os que participam do eixo HPA e HPG (eixo Hipotálamo-Pituitária-Gonadal), por exemplo, e por respostas autonômicas simpáticas.

Os glicocorticóides são hormônios esteroidais secretados em resposta à ativação do eixo HPA por agentes estressores como as endotoxinas de bactérias gram-negativas. Tal estresse rapidamente estimula neurônios liberadores de CRH do núcleo paraventricular do hipotálamo caindo na eminência mediana que alcança receptores na hipófise liberando ACTH que, por sua vez, estimula o córtex da adrenal a liberar glicocorticóide. Este hormônio apresenta diversas funções e entre elas a capacidade antiinflamatória e imunossupressora (DOUGLAS, 2005).

A prolactina foi apontada como fator capaz de promover o balanço na secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias das respostas Th1 e Th2 respectivamente, (DOUGLAS, 2010). Segundo este mesmo autor, este balanço é essencial para manutenção da tolerância imunológica, característica do microambiente uterino durante a gestação, e a administração de LPS causa diminuição da concentração de prolactina periférica, o que poderia causar desbalanço de citocinas prejudicando gestação.

A diminuição da secreção de prolactina poderia levar a redução dos níveis de progesterona, que também atua no balanço das citocinas no ambiente em questão. Portanto, a redução desses dois hormônios, nessas condições, estimularia o aumento da secreção parácrina de citocinas pró-inflamatórias (*IL-12*, *IL-1*, *IL-6* e *TNF- $\alpha$* ), além de gerar consequências neurobiológicas como ansiedade e depressão (KAMMERER et al., 2006; RICH-EDWARDS et al., 2008; LACASTER et al., 2010).

O sistema nervoso simpático também apresenta resposta frente ao estresse a partir dos hormônios catecolaminérgicos (adrenalina e noradrenalina) que favorecem a disponibilização energética pela rápida mobilização de glicose. Além disso, proporcionam a ativação de mecanismos centrais noradrenérgicos do troco cerebral para o sistema límbico e hipotálamo que, pela interação com vários sistemas neuroendócrinos apresentam respostas ao estresse como comportamento de ansiedade, medo ou agressão (DOUGLAS, 2005; 2010).

Nossos estudos apontam que trinta minutos após a administração do LPS, o organismo responde com o influxo de células *uNK* imaturas para o ambiente uterino, alcançando o sítio de implantação embrionária pela região 1. Além disso, as células *uNK* maduras e senescentes (subtipo 3 e 4) passam a apresentar alterações em sua morfologia, que vão desde grânulos vazios até descontinuidade na marcação da membrana e ausência de marcação nos grânulos citoplasmáticos.

O quadro clínico da sepse apresenta como sintoma a vasodilatação periférica o que compromete a oferta de oxigênio aos tecidos. Nesse sentido, a hipoperfusão uterina poderia levar a acidose metabólica fetal (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005). Nesse mesmo período (30 minutos após a administração de LPS) a reatividade de vasos sanguíneos para o anticorpo anti- $\alpha$ -actina diminuiu como constatado em nossos ensaios imunocitoquímicos. A evidente diminuição nesta reatividade sugere que durante a gestação de camundongos submetidos à sepse ocorre o relaxamento dos vasos no ambiente uterino possivelmente para proporcionar um maior aporte sanguíneo à decídua e ao embrião para restabelecimento da homeostase.

Ainda nesse período pós-tratamento, mas agora sobre um ponto de vista comportamental e neurocognitivo, os camundongos se demonstraram apáticos, ou seja, em estado caracterizado pelo desinteresse geral, indiferença ou insensibilidade

aos acontecimentos, como pôde ser demonstrado pela diminuição da taxa de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado e pela diminuição da exploração de todos os componentes utilizados no teste de reconhecimento de objetos.

Após uma hora da administração de LPS tanto a apatia quanto diminuição da marcação para  $\alpha$ -actina persistiram, mas nesse momento se estabeleceu o comportamento análogo à ansiedade, caracterizado como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e provável ocorrência.

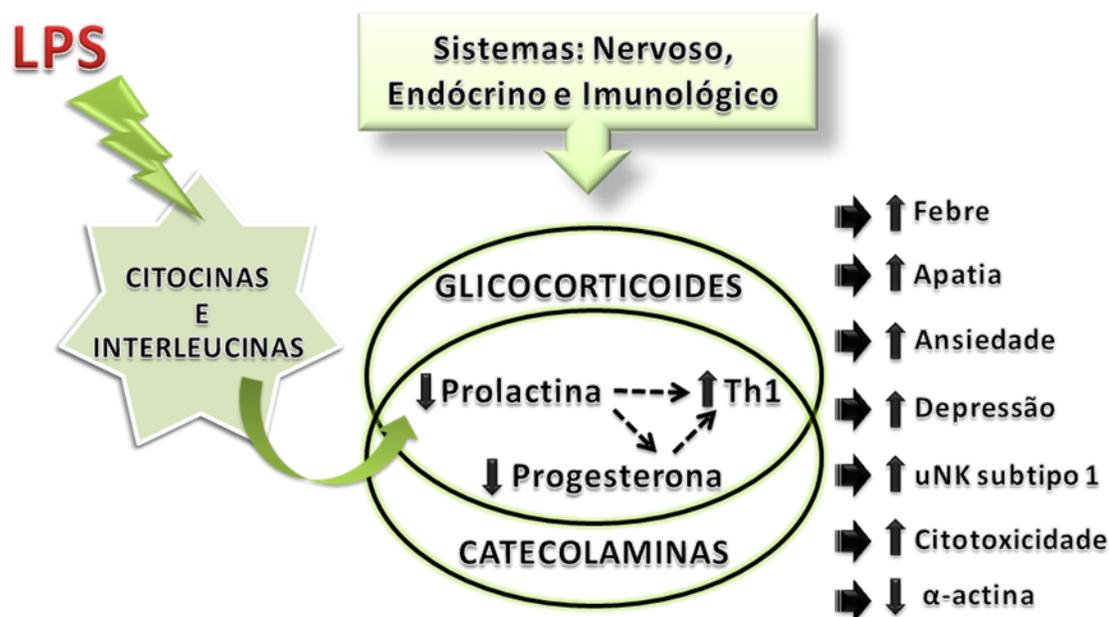
No mesmo momento em que o comportamento análogo à ansiedade se estabeleceu, o número de células *uNK* dos subtipos 3 e 4 decaiu ao passo que a quantidade de células *NK* alteradas aumentou. Concomitante a esses eventos, a marcação para perforina (parte do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos das células *uNK*) diminuiu, sugerindo a ocorrência de degranulação. Tais efeitos podem ter ocorrido em função da diminuição de prolactina e progesterona que além de causar efeitos neurobiológicos, também gera desbalanço das citocinas no ambiente uterino (SZEKERESBARTHO; WEGMANN, 1996; SZEKERESBARTHO, 1997).

Na segunda hora pós-tratamento, os comportamentos febril e depressivo se estabeleceram. Como descrito anteriormente, a febre apresenta um valor adaptativo para o animal, uma vez que favorece sua recuperação aumentando a proliferação de linfócitos, ativando neutrófilos envolvidos na destruição de bactérias, auxiliando a síntese de anticorpos e diminuindo a multiplicação de agentes termossensíveis. O estabelecimento do comportamento análogo à depressão pode ser associado à anedonia, alterações cognitivas e psicomotoras.

Concomitante a isso, foi observado o pico na quantidade das células *uNK* alteradas nas 3 regiões estudadas dos sítios de implantação embrionária, e a falta da marcação de perforina persistiu.

No último período pós-tratamento avaliado, os quadros de apatia, febre, ansiedade e depressão ainda puderam ser observados, no entanto, a quantidade de células do subtipo 3 e 4 se restabeleceu ao passo que a quantidade de células *uNKa* diminuiu, fato este que pode ter ocorrido por influência da IL-10 como discutido anteriormente.

Nossos achados na investigação morfofisiológica do útero e das células *uNK* aliados aos conhecimentos da neuroimunoendocrinologia descritos na literatura nos permitem a construção da seguinte hipótese para o efeito de caráter estressor do LPS de camundongos durante a gestação (**FIGURA 12**).



**Figura 12** - Organograma que sintetiza as hipóteses para os mecanismos envolvidos nas alterações observadas durante a gestação em função do estresse provocado pela administração de LPS em camundongos no décimo dia de gestação. A exposição ao LPS identificada pela ligação à receptores TLR4, induzem a produção de citocinas e interleucinas que acarretam em mudanças neuroimunoendócrinas representando valores adaptativos para o animal, favorecendo sua recuperação e restabelecendo a homeostasia. Os glicocorticóides e catecolaminas são conhecidamente secretados em resposta ao estresse. Estes hormônios, somados à prolactina e progesterona, podem romper o equilíbrio da resposta Th1/Th2 fundamental para o sucesso da gestação.

Fonte - Modificado a partir de Douglas (2010).

É possível que, por provocar a secreção de citocinas e interleucinas pelo sistema imune (MIYAKE, 2004; JANEWAY et al., 2007), o LPS induza a síntese de glicocorticóides e catecolaminas que por sua vez têm o potencial comprovado (DOUGLAS, 2005) de causar a diminuição da expressão de prolactina e progesterona causando aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (tipo Th1). Este desbalanço na resposta Th1/Th2 pode levar ao aumento da febre, apatia, ansiedade e

depressão, característico do estado doentio, concomitantemente ao aumento do influxo de precursores das células *uNK* para a região 1 (PAFFARO JR et al., 2003) do ambiente uterino e indução da citotoxicidade de *uNK* mediada por perforina. A expressão fisiológica de IL-10 em resposta a situação de sepse (MURPHY et al., 2005) em conjunto com o relaxamento dos vasos que nutrem o embrião e a decídua, podem reverter os efeitos do LPS restaurando a homeostase uterina .

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por nossos estudos comportamentais, somados aos obtidos pelos estudos morfológicos, citoquímicos e estereológicos nos permitem concluir que:

- O tratamento com LPS induziu, nos camundongos prenhes, estado febril e depressivo após 2 horas do tratamento, comportamento de ansiedade após 1 hora e resultou em queda da capacidade de exploração de memória sem alterar a memória de curto prazo destes animais. Portanto, a prenhez parece prevenir a perda de memória recente (de curto prazo) em animais tratados com LPS, mas não impede o estabelecimento da febre e as mudanças etológicas que caracterizam o comportamento doentio.

- A grande seletividade da citoquímica de Lectina DBA permitiu a identificação, caracterização e quantificação segura dos subtipos normais de *uNK* (subtipo 1 a 4) e alterados (*uNKa*) em nossos estudos, comprovando a eficiência deste método também em modelos animais com gestação modificada.

- As células *uNK* DBA reativas aumentam rapidamente e expressivamente em número após 30 minutos do tratamento com LPS e este número tende ao restabelecimento para número normal 4 horas após o tratamento.

- O tratamento com LPS provoca aumento expressivo e rápido no número de células *uNK* do subtipo 1 e 2 (formas imaturas) em regiões mais distantes do embrião, sugerindo recrutamento acentuado de células precursoras das *uNK* durante a sépse em camundongos prenhes.

- O LPS causa aumento no número de células *uNKa* a partir de 30 minutos após tratamento, concomitantemente a diminuição em número das formas mais diferenciada (subtipo 3) e em provável senescência (subtipo 4), sugerindo que as *uNK* mais

maduras são as mais afetadas e/ou responsivas à situação de sépsis durante a gestação.

- A redução no número de *uNK* após 4 horas do tratamento com LPS concomitante ao aumento da incidência de *uNK* do subtipo 3 e 4 neste período indicam que os efeitos do LPS sobre as células *uNK* são revertidos rapidamente durante a gestação.

- A injeção intraperitoneal de LPS causa perda da reatividade para perforina nos grânulos das *uNK* evidenciada pela imunocitoquímica, o que indica que estas células podem ser ativadas para citotoxicidade durante a sepse de camundongos prenhes.

- A sepse mimetizada pelo LPS parece provocar o relaxamento da musculatura lisa dos vasos uterinos que nutrem a decídua e o embrião e este relaxamento pode ocorrer como parte de um mecanismo de restabelecimento da homeostasia uterina durante a gestação frente à infecção.

- O LPS provoca perda gradativa da reatividade para  $\alpha$ -actina em uma região polarizada das células *uNK* e esta reatividade é restaurada após 4 horas do tratamento.

- O estudo comportamental nos parâmetros de ansiedade, depressão e memória relacionados diretamente ao estudo do estresse executados em nossos trabalhos, foram importantes tanto para avaliação de animais tratados com LPS, quanto para avaliação das condições de manutenção dos animais utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal *N*-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neurosci Lett**, Miyazaki, v. 356, p. 191–194, 2004.

ABRAHAMS, V. M. et al. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. **J. Immunol.**, New Haven, v. 173, n. 7, p. 4286–4296, 2004.

ACAR, N.; USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine *Natural Killer (uNK)* cells and their missions during pregnancy: A review. **Acta Histochemica**, Antalya, v. 113, p. 82-91, 2011.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **Eur J Pharmacol.**, Rochester, v. 405, p. 167-176, 2000.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, João Pessoa, v. 8, p. 310-322, 2001.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Rev Bras Psiquiatr.**, São Paulo, v. 29, n.4, p. 363-369, 2007.

ASHKAR, A. A.; CROY, B. A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.**, Guelph, v. 61, p. 493-502, 1999.

ASHKAR, A. A., DI SANTO, J. P., CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine *Natural Killer* cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, Guelph, v. 192, p. 259-570, 2000.

ASHKAR A. A. et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine *NK* cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol.**, Hamilton, v. 171, p.2937–2944, 2003.

AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol Biochem Behav.**, Mount Scopus, v. 64, n.4, p.787-796, 1999.

BARICHELLO, T. et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Criciuma, v. 40, p. 831-837, 2007.

BAKER, K. B.; KIM, J. J. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. **Learn Mem.**, New Haven, v. 9, p. 58-65. 2002.

BAUER, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J Clin Endocrinol Metab.**, Vienna, v. 89, p. 812–822, 2004.

BAUME, D. M. et al. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human *Natural Killer* cells. **Eur J Immunol.**, Boston, v. 22, p. 1–6, 1992.

BELVIN, M. P.; ANDERSON, K. V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* Toll-Dorsal pathway. **Annual Review of Cell and Development Biology**, Berkeley, v. 12, p. 393-416, 1996.

BERNARD, O. et al. Immunological studies of mouse decidual cells. 1. Membrane markers of decidual cells in the days after implantation. **J. Exp. Med.**, Bicetre, n. 148, n. 2, p. 580-591, 1978.

BLATTEIS, C. M. et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, Memphis, v. 76, p.1-18, 2005.

BORZYCHOWSKI, A. M. et al. Functional analysis of murine uterine *Natural Killer* cells genetically devoid of estrogen receptors. **Placenta**, Research Triangle Park, v. 24, p. 403-411, 2003.

BESEDOVSKY, H. O. et al.. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, v. 233, p. 652–654, 1986.

BLALOCK, J.E. The immune system as a sensory organ. **J Immunol.**, v.132, n. 3, p. 1067-1070, 1984.

BRENNAN, J. et al. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by LY49: specificities and domain interactions. **J. Exp. Med.**, Vancouver, v. 183, p. 1553-1559, 1996.

BULMER, J. N.; LASH, G. E. Human uterine Natural Killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol.**, Newcastle, v. 42, p. 511-521, 2005.

BURNETT, T.G.; HUNT, J.S. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. **J. Immunol.**, Kansas city, v. 164, p. 5245-5250, 2000.

BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ Shock.**, Morganrown, v. 43, n. 3, p.137-153, 1994.

CARLYLE, J.R. et al. *Natural Killer* cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. **J Immunol.**, Ontario, v. 160, p. 744-753, 1998.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Florianópolis, v. 29, p. 1193-1205, 2005.

CHANTAKRU, S. et al. A study on the density and distribution of uterine *Natural Killer* cells at mid pregnancy in mice genetically ablated for CCR2, CCR 5 and the CCR5 receptor ligand, MIP-1 alpha. **J. Reprod. Immunol.**, Guelph, v. 49, p. 33-47, 2001.

COOPER, M. A. et al. Human *Natural Killer* cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood**, Columbus, v. 97, p.3146–51. 2001.

CROY, B. A.; KISO, Y. Granulated metrial gland cells, a *Natural Killer* cell subset of the pregnant murine uterus. **Microsc. Res. Tech.**, Guelph, v. 25, p. 189-200. 1993.

CROY, B. A. et al. Uterine *Natural Killer* cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. **Am. J. Reprod. Immunol.** Guelph, v. 37, p. 463-470, 1997.

CROY, B. A. et al. A. Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine *Natural Killer* cells during pregnancy. **Placenta**, Guelph, v. 21, p. 77-80, 2000.

CROY, B. A. et al. Update on pathways regulating the activation of uterine *Natural Killer* cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J Reprod Immunol.**, Guelph, v. 59, p. 175-191, 2003a.

CROY, B. A. et al. Uterine *Natural Killer* cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, Guelph, v. 126, p. 149-160. 2003b.

CROY, B. A. et al. Analysis of uterine *Natural Killer* cells in mice. In: CAMPBELL, K. S. **Natural Killer cell protocols**, 2. ed. Totowa, NJ. Humana Press, 2010. p. 465–503.

CROY, B. A. et al. Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol Biol.**, Kingston, v. 612, p. 465-503, 2010.

COSTA-PINTO, F. A. et al. Neural correlates of IgE-Mediated Allergy. **Ann NY Acad Sci.**, São Paulo, v. 1088 p. 116-131, 2006.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.** Bordeaux, v. 856, p. 132-138, 1998.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.**, Bordeaux, v. 840, p. 586-590, 1998.

DELGADO, S. R. et al.. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a *Natural Killer* cell population, from the pregnant mouse uterus. **J. Leukoc. Biol.**, Guelph, v. 59, p. 262-169, 1996.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J Endotoxin Res.**, Denver, v. 10, n. 4, p. 201-222, 2004.

DI SANTO, J. P. *Natural Killer* cell developmental pathways: a question of balance. **Annu Rev Immunol.**, Paris, v. 24, p. 257–286, 2006.

DOUGLAS, A. J. Vasopressin and oxytocin. In: STECKLER, T.; KALIN N. H.; REUL J. M. H. M. (Ed.) **Handbook of stress and the brain**. Part 1: the neurobiology of stress, Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 205–229.

DOUGLAS, A. J. Baby on board: do responses to stress in the maternal brain mediate adverse pregnancy outcome? **Front Neuroendocrinol**, Edinburgh, v.31, p. 359-376, 2010.

DOUGLAS, A. J. Mother-offspring dialogue in early pregnancy: Impact of adverse environment on pregnancy maintenance and neurobiology. **Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry**, Edinburgh, v.3, p. 1-11, 2010.

DUNK, C. et al. Angiotensin-1 and angiotensin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. **Am J Pathol**, Birmingham, v. 156, p. 2185–2199, 2000.

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci**, Gainesville, v. 43, p. 429–435, 1988.

DUNN, A. J. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. **J Pharmacol Exp Ther**, Gainesville, v. 261, p. 964–969, 1992.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Rev**, Shreveport, v. 29, p. 891-909, 2005.

ELOVITZ, M. A.; MRINALINI, C. Animal models of preterm birth. **Trends Endocrinol. Metab**, Pennsylvania, v. 15, p. 479–487, 2004.

ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve— an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacol Rev**, Bethesda, v. 52, p. 595-638, 2000.

ENANGA, B. et al. Sleeping sickness and the brain. **Cell Mol Life Sci. May**, Glasgow, v. 59, n. 5, p. 845-858, 2002.

ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood–brain barrier. **J Mol Med**, Linköping, v. 80, p. 5–15, 2002.

ENGBLOM, D. et al. Microsomal prostaglandin E synthase1 is the central switch during immuneinduced pyresis. **Nat Neurosci**, Linköping, v. 6, p. 1137–1138, 2003.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioural data. **Behav Brain Res**, Paris, v. 31, p. 47–59, 1988.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, E. R. et al. Sepsis during pregnancy. **Crit Care Med**, Rochester, v. 33, p. 286-293, 2005.

FILE P. S. et al., Characterization of phenomenon of ‘one-trial tolerance’ to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, London, v. 102, p. 98–101, 1990.

FILE, S. E. Factores controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav Brain Res**, London, v. 125, p. 151-157, 2001.

FISHER, S. A.; IKEBE, M.; BROZOVICH, F. Endothelin-1 alters the contractile phenotype of cultured embryonic smooth muscle cells. **Circ Res**, Ohio, p. 80, v. 885–893, 1997.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **N. Engl. J. Med**. Birmingham, v. 342, p. 1500–1507, 2000.

GIUSTI-PAIVA, A et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Ribeirão Preto, v. 447, p. 175–180, 2003.

GOODIER, M. R.; LONDEI, M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56<sub>+</sub>CD3<sub>+</sub> NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10. **J. Immunol**, London, v. 165, p. 139–147, 2000.

GRAHAM, C. H. et al. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. **Exp Cell Res**, Kingston, v. 214, p. 93–99, 1994.

GREENWOOD, J. D. et al. Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine *Natural Killer* cells. **Placenta**, Guelph, v. 21, p. 693-702, 2000.

GUIMOND, M. J. et al. Absence of *Natural Killer* cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. **Biol. Reprod**, Guelph, v. 56, p. 169-179, 1997.

GUIMOND, M. J.; WANG, B.; CROY, B. A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in *Natural Killer* cell-deficient tg epsilon 26 mice. **J Exp Med**, Guelph, v.187, p. 217–223, 1998.

GUINN, D. A.; ABEL, D. E.; TOMLINSON, M. W. Early goal directed therapy for sepsis during pregnancy. **Obstet Gynecol Clin North Am**, Portland, v. 34, p. 459-479, 2007.

GUYRE, P. M. et al. Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. **J Steroid Biochem**, Hanover, v. 30, p. 89-93, 1988.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alphaadrenoceptor agonists in a maze-exploration model of “fear” - motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HANNA, N. et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **J Immunol**, Brown, v. 164, p. 5721-5728, 2000.

HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. **Nat Med**, Jerusalem, v. 12, p. 1065–1074, 2006.

HAUGER, R. L. et al. Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. **Ann N Y Acad Sci**, San Diego, v. 1179, p. 120–143, 2009.

HEAD, J.R. Uterine *Natural Killer* cells during pregnancy in rodents. **Nat. Immun**, Dallas, v. 15, p. 7-21, 1996.

HENDERSON, T. A. et al. Steroid receptor expression in uterine *Natural Killer* cells. **J Clin Endocrinol Metab**, Edinburgh, v. 88, p. 440–449, 2003.

HIBY, S. E. et al. Human uterine *NK* cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. **Mol. Immunol**, Cambridge, v. 34, p. 419-430, 1997.

HIBY, S. E. et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, Cambridge, v. 23, p. 972–976, 2008.

HO, H. N. et al. Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy. **Hum Immunol**, Taiwan, v. 49, p. 130–136, 1996.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, London, v. 53, p. 271-275, 1996.

HORI, T. et al. Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. **Ann N Y Acad Sci**, Fukuoka, v. 917, p. 106-120, 2000.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**, St Louis, v.348, n. 2, p. 138-150, 2003.

IGARASHI, T. et al. Involvement of granule-mediated apoptosis in the cyclic changes of the normal human endometrium. **Tohoku J Exp Med**, Sendai, v. 193, p. 13–25, 2001.

- JONES, R. K. et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferative activity in human endometrial stroma and endometrial granulated lymphocytes. **Biol Reprod**, Newcastle, v. 58, p. 995–1002, 1998.
- KAMMERER, M.; TAYLOR, A.; GLOVER, V. The HPA axis and perinatal depression: a hypothesis. **Arch. Wom. Mental Health**, London, v. 9, p. 187–196, 2006.
- KARLHOFFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated *Natural Killer* cells. **Nature**, California, v. 2, p. 66-70, 1992.
- KENT, S. et al. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, Stanford, v. 20, n. 1, p. 171-175, 1996.
- KING, A.; LOKE, Y. W. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. **Immunol. Today**, Cambridge, v. 12, p. 432-435, 1991.
- KING, A.; GARDNER, L.; LOKE, Y. W. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Hum Reprod**, Cambridge, v. 11, p. 1079–1082, 1996.
- KING, A. et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual *NK* cell receptors. **Placenta**, Cambridge, v. 21, p. 81-85, 2000.
- KISO, Y. et al. Histological assessment of the mouse uterus from birth to puberty for the appearance of LGL-1+ *Natural Killer* cells. **Biol. Reprod**, Guelph, v. 47, p. 227-232, 1992.
- KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, Michigan, v. 71, p. 93-127, 1991.
- KOOPMAN, L. A. et al. Human decidual *Natural Killer* cells are a unique *NK* cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med**, Cambridge, v. 198, p. 1201–1212, 2003.

KOPCOW, H. D. et al. Human decidual *NK* cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **Proc Natl Acad Sci USA**, Cambridge, v. 102, p. 15563–15568, 2005.

KOPYDLOWSKI, K. M. et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. **J. Immunol**, Bethesda, v. 163, p. 1537–1544, 1999.

KUSAKABE, K. et al. Effect of danazol on *NK* cells and cytokines in the mouse uterus. **Reprod Dev**, Osaka, v. 53, p. 87-94, 2007.

KRUSE, A. et al. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. **Biol Reprod**, Lübeck, v. 66, p. 333–345, 2002.

LANCASTER, C. A. et al. Risk factors for depressive symptoms during pregnancy: a systematic review, **Am. J. Obstet. Gynecol**, Michigan, v. 202, p. 5–14, 2010.

LANGER, N. O.; BEACH, D.; LINDENBAUM, E. S. Novel hyperactive mitogen to endothelial cells: human decidual *NKG5*. **Am. J. Reprod. Immunol**, Haifa, v. 42, p. 263-272, 1999.

LANIER, L. L. et al. *Natural Killer* cells: definition of a cell type rather than a function. **J Immunol**, Palo Alto, v. 137, p. 2735–2739, 1986a.

LANIER, L. L. Activating and inhibitory *NK* cell receptors. **Adv. Exp. Med. Biol**, Palo Alto, v. 452, p. 13-18, 1998.

LASH, G. E. et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J Leukoc Biol**, Newcastle, v. 80, p. 572-580, 2006.

LASH, G. E.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Review: functional role of uterine natural killer (*uNK*) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta**, Newcastle, v. 31, p. S87–S92, 2010.

LEONARD, B. E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, Galway, v. 25, p. 767-780, 2001.

LI, X. F. et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine *Natural Killer* cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, Cambridge, v. 86, p. 1823-1834, 2001.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Braz J Med Biol Res**, California, v. 33, p. 1141-1148, 2000.

LIN, H. et al. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **J Immunol**, Alberta, v. 151, p. 4562-4573, 1993.

LINNEMEYER, P. A.; HAMILTON, M. S. A monoclonal antibody, 4h12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine deciduas. **J. Reprod. Immunol**, Washington, v. 17, p. 279-294, 1990.

LIPPE, E. M. O. **Avaliação da expressão de isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária.** 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. v. 92, p. 180–185, 1987.

LOKE, Y. W.; KING, A. In: **Human Implantation: Cell Biology and Immunology.** Cambridge: Cambridge University Press; 1995.

LOKE, Y. W.; KING, A. Immunology of implantation. **Baillieres Best Pract Res Clin. Obstet. Gynaecol**, Cambridge, v. 14, p. 827-837, 2000.

MAKRIGIANNIS, A. P.; ANDERSON, S. K. Mechanisms Controlling the Expression and Diversity of the Ly49 gene family. **Mod. Asp. Immunol.** v. 1, p. 228-232, 2001.

MANASTER, I.; MANDELBOIM, O. The Unique Properties of Uterine NK Cells. **Am J Reprod Immunol**, Jerusalem, v.63, p. 434–444, 2010.

- MASON, L. H. et al. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the LY49 gene family (LY49G2). **J. Exp. Med**, Maryland, v. 182, p. 293-303, 1995.
- MASON, L. H. et al. Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. **J Immunol**, Maryland, v. 160, p. 4148-4152, 1998.
- MATALKA, K. Z.; ALI, D. A. Stress-induced versus preovulatory and pregnancy hormonal levels in modulating cytokine production following whole blood stimulation. **Neuroimmunomodulation**, Amman, v. 12, p. 366–374, 2005.
- MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Front BiosciSep**, Kyoto, v.9, p. 2819-2826, 2004.
- MCQUEEN, K. L. et al. Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c. **Immunogenetics**, Vancouver, v. 48, p. 174-183, 1998.
- MINGARI, M. C. et al. Interleukin-15-induced maturation of human *Natural Killer* cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/*NKG2-A* as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. **Eur J Immunol**, Genova, v. 27, p. 1374–1380, 1997.
- MIRANDA, D. J. et al. In vitro effect of bacterial lipopolysaccharide on the cytotoxicity of human natural killer cells. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol**, Santiago, v. 100, p. 3–14, 1998.
- MUKHTAR, D. D.; STEWART, I. J.; CROY, B. A. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. **Reprod. Immunol**, Southampton, v. 15, p. 269-279, 1989.
- MURPHY, S. P. et al. Uterine NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. **J Immunol**, Brown, v. 175, p. 4084-4090, 2005.
- NAKAMURA, M. C. et al. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in *Natural Killer* cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. **J Exp Med**, Sanfrancisco, v. 185, p. 673-684, 1997.

NORMAN, G.; EACOTT, M. J. Impaired object recognition with increasing levels of feature ambiguity in rats with perirhinal cortex lesions. **Behav Brain Res**, Durham, v. 148, p. 79–91, 2004.

OHMURA, Y.; YOSHIOKA, M. The roles of corticotropin releasing factor (CRF) in responses to emotional stress: is CRF release a cause or result of fear/anxiety? **CNS Neurol Disord Drug Targets**, Sapporo, v. 8, p. 459–469, 2009.

OKADA, H. et al. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, Osaka, v. 85, p. 4765–4770, 2000.

OKUDA, S.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. **Proc Natl Acad Sci U S A**, California, v. 101, p. 853–858, 2004.

OLCESE, L. et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. **J Immunol**, Marseille, v. 156, p. 4531–4534, 1996.

OTA, M.; CROFTON, J. T.; FESTAVAN, G. T. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. **Neuroendocrinology**, Memphis, v. 57, p. 955–959, 1993.

OWYANG, C.; HASLER, W. L. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. VI. Pathogenesis and therapeutic approaches to human gastric dysrhythmias. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Michigan, v. 283, p. G8-15, 2002.

PACHECO-LOPEZ, G. et al. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. **J Neurochem**, Essen, v. 86, p. 1024–1031, 2003.

PAFFARO JR, V. A. et al. Subset Classification of Mouse Uterine *Natural Killer* Cells By DBA Lectin Reactivity. **Placenta**. Campinas, v. 24, p. 479–488, 2003.

ZAVAN, B. et al. Adhesion Molecules in mouse pregnant uterus. **The Anatomical Record**, Alfenas, v. 293, p. 1081-1088, 2010.

PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressivelike behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**, Alfenas, v. 215, p.146–151, 2010.

PARR, E. L. et al. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are *Natural Killer*-like cells that contain perforin and serine esterases. **J. Immunol**, Southern Illinois, v. 145, p. 2365-2372, 1990.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med**, Chicago, v. 113, p. 227–242, 1990.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**, Southampton, v. 115, p. 1-7, 1989.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plusmaze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, p. 525-529, 1986.

PERUSSIA, B.; CHEN, Y.; LOZA, M. J. Peripheral *NK* cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. **Mol Immunol**, Philadelphia, v. 42, p.385–395, 2005.

PIJNENBORG, R. et al. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. **Placenta**, v. 4, p. 397–413, 1983.

PLEVYAK, M. et al. Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: A lack of correlation with the decidual immune cell profile. **Am J Reprod Immunol**, Brown, v. 47, p. 242-250, 2002.

PLOUGASTEL, B. F.; YOKOYAMA, W. M. Extending missing-self? Functional interactions between lectin-like *NK*rp1 receptors on *NK* cells with lectin-like ligands. **Curr Top Microbiol Immunol**, St Louis, v. 298, p. 77-89, 2006.

POLLARD, J. W. et al. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSD-1 in female fertility. **Dev. Biol**, Bronx, v. 148, p. 273-283, 1991.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psych**, Bethesda, v. 149, p. 999-1010, 1992.

PORSOLT, R. O.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Internat Pharma Ther**, v. 229, p. 327-336, 1977.

PUZANOV, I. J.; BENNETT, M.; KUMAR, V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of *Natural Killer* cells. **J Immunol**, Dallas, v. 157, p. 4282–4285, 1996.

RAMACHANDRA, R.N., SEHON, A.H., BERCZI, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain Behav Immun**, Winnipeg, v. 6, p. 157-169, 1992.

RAMPON, C. et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat Neurosci**, New Jersey, v. 3, p. 238–244, 2000.

RAULET, D. H.; VANCE, R. E.; MCMAHON, C. W. Regulation of the *Natural Killer* cell receptor repertoire. **Annu. Rev. Immunol**, Berkeley, v. 19, p. 291-330, 2001.

REDLINE, R.W., AND LU, C.Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. **Lab. Invest**, Boston, v. 61, p. 27-36, 1989.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C. A. B. *Obstetrícia fundamental*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003. p. 73-87.

RICH-EDWARDS, J. W. et al. Lifetime maternal experiences of abuse and risk of prenatal depression: influence of socioeconomic position and race/ethnicity. **Am. J. Epidemiol**, Boston, v.40, p. S99-167, 2008.

RITZ, J. et al. Characterization of functional surface structures on human *Natural Killer* cells. **Adv Immunol**, Boston, v. 42, p. 181–211, 1988.

ROMAN, S.S. **Caracterização morfológica e comportamental das células Nku em camundongos após lesão embrionária nos diferentes períodos gestacionais.** 2001. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e estrutural) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2001.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci.**, Phoenix, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

ROMANOVSKY, A. A.; STEINER, A. A.; MATSUMURA, K. Cells that trigger fever. **Cell Cycle**, Phoenix, v. 5, p. 2195-2197, 2006.

ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Front Biosci**, Phoenix, v. 9, p. 494-504, 2004.

ROMERO, R. et al. Two-thirds of spontaneous abortion/fetal deaths after genetic midtrimester amniocentesis are the result of a pre-existing subclinical inflammatory process of the amniotic cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v. 172, p. 261-267, 1995.

ROTH I. et al. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. **J Exp Med**, San Francisco, v. 184, p. 539-548, 1996.

SANDBO, N. et al. Downregulation of smooth muscle  $\alpha$ -actin expression by bacterial lipopolysaccharide. **Cardiovascular Res**, v. 74, p. 262-269, 2007.

ROSA, R. M. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci Lett**, Rio Grande do Sul, v. 341, p. 217-220, 2003.

SCHMITZ, T, et al. PDE4 Inhibition Prevents Preterm Delivery Induced by an Intrauterine Inflammation. **J. Immunol**, Paris v. 178, p. 1115–1121, 2007.

SHEFFIELD J.S. Sepsis and septic shock in pregnancy. **Crit Care Clin**, Dallas, v. 20, p. 651-660, 2004.

SHEIKHI, A. K. et al. Are *Natural Killer* cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? **Pak J Biol Sci**, Zanjan, v. 10, p. 2885-2889, 2007.

SILVA, E. et al. Sepsis: from bench to bedside. **Clinics**, São Paulo, v. 63, p. 110-120, 2008.

SILVER, E. T. et al. Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H 2D(k) and H-2D(d). **J Immunol**, Alberta, v. 166, p. 2333-2341, 2001.

SLATTERY, M. M.; MORRISON, E. J. J. Preterm delivery. **Lancet**, Galway, v. 360, p. 1489–1497, 2002.

SMITH, K. M. et al. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. **J Immunol**, Palo Alto, v. 161, p. 7-10, 1998.

SMYTH, M. J. et al. Activation of *NK* cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, Palo Alto, v. 42, p. 501-510, 2005.

SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Be**, Fortaleza, v. 78, p. 27-33, 2004.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci**, Phoenix, v. 8, p. S1398-1408, 2003.

STEWART, I.; PEEL, S. Granulated metrial cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. **J. Anat**, Sothampton, v. 133, p. 535-541, 1981.

STEWART, I. J.; PEEL S. Mouse metrial gland cells do not kill Yac-1 myeloma cells. **J. Reprod Immunol**, Sothampton v. 24, p.165-171, 1993.

SUN, J. C.; BEILKE, J. N.; LANIER, L. L. Adaptive immune features of *Natural Killer* cells. **Nature**, San Francisco, v. 457, p. 557–561, 2009.

SZEKERESBARTHO, J.; WEGMANN, T. G., A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. **J. Reprod. Immunol**, Pecs, v. 31, p. 81–95, 1996.

SZEKERESBARTHO, J. Progesterone-induced immunosuppression, **Hum. Reprod**, Pecs, v.12, p. 629-632, 1997.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN, A. J. Effects of interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmac.Biochm. and Behavior**, Louisiana, v. 86, p. 651–659, 2007.

TANG, Y. P. et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, New Jersey, v. 401, p. 63-69, 1999.

TAYADE, C. et al. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine *Natural Killer* cells. **J Leukoc Biol**, Guelph, v. 78, p. 1347-1355, 2005.

TRINCHIERI, G. Biology of *Natural Killer* cells. **Adv Immunol**, Philadelphia, v. 47, p.187–376, 1989.

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and *NK* receptor genes. **Immunity**, Cambridge, v. 15, p. 363-274, 2001.

TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. **Tissue Antigens Review**, Cambridge, v. 63, p. 1–12, 2004.

TURNBULL AV, L. E. E. S.; RIVIER, C. Mechanisms of hypothalamic–pituitary–adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. **Ann N Y Acad Sci**, La Jolla, v. 840, p. 434–43, 1998.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, Kyoto, v. 395, p. 281–284, 1998.

VACCA, P. et al. Analysis of *Natural Killer* cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks *NK* cell function. **Blood**, Genova, v. 108, p. 4078–4085, 2006.

VAN DEN HEUVEL, M. J. et al. A review of trafficking and activation of uterine *Natural Killer* cells. **Am J Reprod Immunol**, London, v. 54, p.322-331, 2005.

VAN OVERVELD, F. J. et al. Inhibitory capacity of different steroids on neutrophil migration across a bilayer of endothelial and bronchial epithelial cells. **Eur J Pharmacol**, Antwerpen, v. 477, p. 261-277, 2003.

VARLA-LEFTHERIOTI, M. et al. Lack of the appropriate *Natural Killer* cell inhibitory receptors in women with spontaneous abortion. **Hum Immunol**, Athens, v. 66, p. 65-71, 2005.

VERMA, S.; KING, A.; LOKE, Y. W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine *Natural Killer* cells. **Eur. J. Immunol**, Cambridge, v. 27, p. 979-983, 1997.

VIGANO, P. et al. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma. **Mol Hum Reprod**, Milan, v. 7, p. 971-977, 2001.

VON RANGO, U. et al. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. **Placenta**, Aachen, v. 24, p. 929–940, 2003.

WANG, W. et al. Corticotropin Releasing Hormone Modulates Endotoxin-Induced Inflammatory Cytokine Expression in Human Trophoblast Cells. **Placenta**, Kingston, v. 28, p. 1032-1038, 2007.

YIRMIYA, R. Behavioral and psychological effects of immune activation: implications for “depression due to a general medical condition.” **Curr. Opinion Psychiatry**, Mount Scopus, v. 10, p. 470–476, 1997.

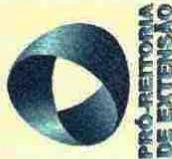
YIRMIYA, R. et al. Cytokines, “depression due to a general medical condition,” and antidepressant drugs. In: DANTZER, R.; WOLLMAN, E. E.; YIRMIYA, R. (Ed.) **Cytokines, stress and depression** Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. 1999. p. 283–316.

YOON, B. H.; PARK, C. W.; CHAIWORAPONGSA, T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. **BJOG**, Seoul, v. 110, p. 124–127, 2003.

YU, J. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity**, Ohio, v. 24, p. 575–590, 2006.

YU, Y. Y. et al. The role of Ly49A and 5E6 (Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine *Natural Killer* cells against normal T cell blasts. **Immunity**, Dallas, v. 4, p. 67-76, 1996.

ZHANG, J., CHEN, Z., SMITH, G.N., CROY, B.A. *Natural Killer* cell-triggered cascular transformation: maternal care before birth?. **Cellular & Molecular Immunology**, Kingston, v. 8, p. 1-11, 2010.



PRÓ-REITORIA  
DE EXTENSÃO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL – MG  
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO



# Certificado

Certificamos que **BRUNO ZAVAN** apresentou, na forma de painel, o trabalho “**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E MORFOFISIOLÓGICAS DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS INFLAMAÇÃO INDUZIDA**”, de autoria de **BRUNO ZAVAN, VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR, VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR, ANDRÉA MOLLIÇA DO AMARANTE PAFFARO, ALEXANDRE GIUSTI PAIVA**, tendo recebido menção honrosa, na III Jornada Científica da UNIFAL-MG, realizada no período de 22 a 24 de setembro de 2010.

Alfenas, 29 de novembro de 2010.



*Claudia Torres*  
**Cláudia Torres**  
COORDENADORA

*Maria de Fátima Sant'Anna*  
**Maria de Fátima Sant'Anna**  
PRÓ-REITORA DE EXTENSÃO

\*2010000000000676000848

## ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 16 de novembro de 2009.

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registrado sob o nº 253/2009, intitulado "Estudo Morfofisiológico e Comportamental após Inflamação Induzida pelo Lipopolissacarídeo (LPS) Durante a Gestação de Camundongos", sob sua coordenação, está em conformidade com os princípios  ticos exigidos na experimenta o animal, tendo sido, portanto, apreciado e aprovado por este Comit .

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Luciano Bruno de Carvalho Silva  
Presidente do CEUA - Unifal-MG