

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KAMILA LEITE RODRIGUES

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DO
ÚTERO DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS ESTRESSE INDUZIDO
POR EXERCÍCIO FÍSICO EXTENUANTE

Alfenas/MG

2011

KAMILA LEITE RODRIGUES

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DO
ÚTERO DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS ESTRESSE INDUZIDO
POR EXERCÍCIO FÍSICO EXTENUANTE

Dissertação apresentada à banca
examinadora para obtenção do título de
Mestre pelo Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
da Sociedade Brasileira de Fisiologia na
Universidade Federal de Alfenas

Alfenas/MG

2011

KAMILA LEITE RODRIGUES

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DO
ÚTERO DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS ESTRESSE INDUZIDO
POR EXERCÍCIO FÍSICO EXTENUANTE

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas
pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de
Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas

Aprovada em:

Profa. Dra Adelina Martha dos Reis

Instituição: UFMG

Assinatura:

Prof. Dra. Márcia Cristina Bizinotto

Instituição: Unifal

Assinatura:

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: Unifal

Assinatura:

Dedico ao meu esposo, aos meus filhos e aos meus pais por estarem presentes em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor, meu marido, pela dedicação, paciência, incentivo, carinho e ternura. Por fazer parte dos meus dias de forma tão maravilhosa e especial, e por me proporcionar tranquilidade e muita felicidade em todos os momentos de nossas vidas.

Aos meus filhos, por toda magia, graça, inteligência e carinho. Meu mundo de transformações e infinito amor.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes, por tanta alegria e por todo amor.

Ao meu orientador prof. Doutor Valdemar Antonio Paffaro Junior que de forma tão especial me acolheu em seu laboratório, me orientou e me permitiu ir além. Pelos conhecimentos transferidos, pela confiança depositada ao longo destes dois anos e por toda sua alegria.

Aos colegas de mestrado, Érika e Bruno, que estiveram presentes em diversos momentos, em muitas viagens e por dividirem comigo seus conhecimentos.

Ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, por levar esta oportunidade as Instituições emergentes e assim proporcionar-me a realização deste trabalho.

A Unifal, por participar do programa multicêntrico e propiciar os meios para a realização do mestrado.

Aos professores e funcionários do laboratório de Biologia Animal Integrativa pelos serviços prestados e alegre convivência.

Aos animais utilizados, por doarem a vida.

A dor e o pranto fazem parte da vida, e sentir que afinal nossas atitudes foram as que pudemos tomar significa que não nos deixamos sempre enganar e conduzir feito manada. Essa é a nossa vida, a nossa múltipla escolha, até o último instante se tivermos fervor e audácia, ou lucidez.

Lya Luft

RESUMO

O exercício aeróbio aumenta o fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, diminuindo esse fluxo em outros órgãos como útero e placenta o que pode prejudicar a oxigenação e nutrição do embrião. O estímulo do exercício extenuante pode ser estressor, aumentando a secreção de glicocorticóides através do eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal e que podem causar complicações durante a gestação, como as observadas em outras situações como o estresse alimentar e após infecção. As células Natural Killer uterinas (*uNK*) correspondem a maior população de leucócitos decíduais de humanos e roedores. As *uNK* de camundongos têm sido muito estudadas por meio da citotóxica de lectina *DBA* (*Dolichos Biflorus Agglutinin*), que tem afinidade para N-acetil-D-Galactosamíase expressa seletivamente nos grânulos e membrana plasmática destas células. Esta seletividade propiciou a caracterização de quatro subtipos de *uNK*, relacionados aos estágios de diferenciação destas células. A função mais aceita das *uNK* é a secreção de *INF- γ* levando a dilatação das artérias espiraladas uterinas para manutenção da decídua e nutrição do embrião. Este estudo teve o objetivo de investigar se o exercício extenuante exerceria efeitos na implantação e integridade embrionária, bem como, no número, diferenciação, distribuição e padrão de reatividade para lectina *DBA* das *uNK*. Dez camundongos *Swiss* fêmeas foram mantidos sedentários (grupo 1). Outros 10 (grupo 2) foram submetidos a natação, do 1º ao 10º dia de gestação (dg), durante 60 minutos diários, dos quais os últimos 20 minutos se procederam com halter com massa de 4% do peso corporal, preso a suas caudas, em dias alternados do 1º ao 5º dg, e de 10% dessa massa do 6º ao 10º dg. Os animais do grupo 3 após prenhez, foram submetidos a natação da mesma maneira que os do grupo 2, porém passaram por um programa de treinamento de 3 semanas anterior a prenhez durante 5 dias/semana, sendo realizado 15 minutos/dia na primeira semana, aumentando gradativamente em 10 minutos/dia até 60 minutos na segunda semana e 60 minutos/dia na terceira semana. Todos os camundongos foram anestesiados e perfundidos com PFA (paraformaldeído) 4% no 10º dg. As taxas de implantação, viabilidade e reabsorção embrionárias foram avaliadas e os sítios de implantação destes animais foram coletados e embebidos em parafina para obtenção de cortes histológicos que foram analisados por lectina *DBA* e HE (Hematoxilina e Eosina). Foram quantificados os 4 subtipos de células *uNK DBA* reativos

em 3 áreas da região mesometrial dos sítios de implantação. Nossos resultados mostraram que o exercício físico extenuante é capaz de causar diminuição na implantação, viabilidade embrionária e aumento na perda fetal, bem como, aumento em número e na diferenciação das células *uNK*, sem aparente ativação de sua citotoxicidade. O exercício realizado previamente a prenhez diminuiu estes efeitos, pois restabeleceu as taxas normais de implantação e o número total de *uNK*, bem como, aumentou a viabilidade e diminuiu a perda embrionária, contudo sem impedir completamente os efeitos deletérios do exercício na gestação. Nossos resultados indicam que esse modelo de estresse poderá ser útil para estudos futuros da investigação dos mecanismos neuroimunoendócrinos, envolvidos com parto prematuro e aborto causado por fatores estressores muitas vezes desconhecidos.

Palavras-Chave: Exercício físico, estresse (Fisiologia), prenhez, Células Natural Killer uterinas.

ABSTRACT

Aerobic exercise increases blood flow to skeletal muscle, decreasing the flow in other organs such as uterus and placenta, which may impair embryo oxygenation and nutrition. Furthermore, the continuous exercise can be stressful, changing the hypothalamic-pituitary-adrenal axis leading to secretion of glucocorticoids that may cause complications during pregnancy, such as those observed in other situations such as dietary and infection-mediated stress. Uterine natural killer cells (uNK) are the largest population of decidual leukocytes from humans and rodents. The mouse uNK have been extensively investigated by the use of DBA lectin cytochemistry, which has affinity for N-acetyl-D-Galactosamine selectively expressed in the granules and plasma membrane of these cells. This selectivity allowed the characterization of four subtypes of uNK related to their stages of differentiation. The most accepted function of uNK is the secretion of IFN- γ leading to dilation of the uterine spiral arteries, maintaining the decidua and embryo nutrition. The goal of this study was to investigate whether strenuous exercise has effect in the embryo implantation and integrity, as well as, in the number, differentiation, distribution and DBA lectin reactivity pattern of uNK cells. Ten female Swiss mice were sedentary (group 1). Other 10 (group 2) were submitted to swimming, from 1st to 10th gestation day (gd) for 60 minutes daily, been the last 20 minutes conducted with a steel caudal dumbbell with 4% of their body masses, attached in alternately days from the 1st to 5th gd, and 10% of this mass from the 6th to 10th gd. The animals from group 3 after pregnancy were submitted to swimming in the same way as group 2, but went through a training program for 3 weeks, 5 days a week, being 15 minutes/day in the first week, increasing gradually by 10 minutes a day up to 60 minutes in the second week and 60 minutes a day in the third week. All mice were anesthetized and perfused with 4% PFA at 10^odg. The rates of embryo implantation, viability resorption were evaluated and the implantation sites of these animals were collected and embedded in paraffin to obtain histological sections that were submitted to DBA lectin and H&E. We quantified the four DBA reactive uNK cells subtypes in three areas of the mesometrial region of the implantation sites. Our results showed that strenuous exercise can cause a decrease in implantation embryo viability and increased fetal loss, as well as increase in number and differentiation of uNK cells, without apparent activation of its cytotoxicity. The exercise performed prior to pregnancy decreased these effects, since restored the normal rates of implantation and the total number of UNK, as well as increased viability and decreased embryonic loss, without completely prevent the deleterious effects of exercise during pregnancy. Our results indicate that this stress model established here may be useful for future studies about the neuroimmunoendocrinology of preterm labor and abortion caused by often unknown stress factors.

Key words: physical exercise, stress, pregnancy, uterine natural killer cells

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico
- ANAVA**- Análise de Variância
- AT** – Área teste
- AT1 e AT2** – Receptor de Angiotensina 1 e 2
- BSA** - Albumina de Soro Bovino
- CRH** – Hormônio liberador de corticotrofina
- HHA** - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
- SNS** - Sistema Nervoso Simpático
- TGF- β 1** - Fator de crescimento transformador- β 1
- Pnk** - Célula Natural Killer Periférica
- uNK** – Célula Natural Killer Uterina
- eNK** – Célula Natural Killer Endometrial
- dNK** – Célula Natural killer Decidual
- INF- γ** – Interferom Gamma
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-13** – Interleucina 13
- TNF- α** – Fator de necrose tumoral
- GM-CSF** – Fator de Estimulador de Colônias de Macrófagos
- GnRH** – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- CD** – Células Dendríticas
- MLAp** - Agregado linfóide mesometrial da gestação
- DBA** - Dolichos Biflorus Agglutinin
- PAS** - Reagente ácido periódico de Schiff
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- I** – Taxa de Implantação
- NL** – Número de corpus lúteos
- ST** – Sítios de implantação totais
- SV** – Sítios de implantação viáveis
- SR** - Sítios em aparente reabsorção
- PIBF** - Fator bloqueador induzido pela progesterona

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

PBS – Solução tampão fosfato salina

IP-10 - Proteína induzida pelo interferon gamma (10 kDa)

PLGF – Fator de crescimento placentário

Ang-2 - Angiopoetina-2

VO₂max- Volume máximo de oxigênio

HE – Coloração por hematoxilina e Eosina

LIF - Fator inibitório de leucemia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 CÉLULAS NATURAL KILLER PERIFÉRICAS.....	13
2.2 CÉLULAS NATURAL KILLER NO ÚTERO.....	15
2.3 UNK ENDOMETRIAIS E UNK DECIDUAIS.....	19
2.4 FUNÇÕES DA CÉLULAS NK UTERINAS.....	23
2.5 EXERCÍCIO FÍSICO, ESTRESSE E GESTAÇÃO.....	27
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 ANIMAIS.....	35
4.2 PROGRAMA DE TREINAMENTO.....	35
4.2.1 Grupo Controle.....	35
4.2.2 Grupo de Treinamento Durante a Gestação.....	35
4.2.3 Grupo de Treinamento Antes e Durante a Gestação.....	36
4.3 ANÁLISE DAS TAXAS DE IMPLANTAÇÃO, VIABILIDADE E PERDA EMBRIONÁRIA.....	37
4.4 PROCESSAMENTO PARA EMBEBIÇÃO EM PARAFINA.....	38
4.5 CITOQUÍMICA COM LECTINA DBA (<i>Dolichos Biflorus Agglutinin</i>).....	38
4.6 ESTUDO ESTEREOLÓGICO EM MICROSCOPIA FOTÔNICA.....	39
4.6.1 Amostragem.....	39
4.6.2 Estudo Estereológico.....	39
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICE.....	85

1 INTRODUÇÃO

A gestação é um momento delicado que exige cuidados para preservação da integridade do novo ser em desenvolvimento no interior do organismo materno. Fatores externos estressores podem causar alterações neuroimunoendócrinas levando a mudanças no micro ambiente uterino causando parto prematuro e aborto.

O micro ambiente uterino durante a gestação é imunologicamente diferente de outros órgãos, sendo que um balanço na resposta Th1 (celular) e Th2 (humoral) parece garantir a tolerância imunogênica existente neste ambiente, evitando assim a rejeição do embrião que é geneticamente diferente do organismo materno.

Neste complexo ambiente onde a tolerância do organismo materno é crucial para o desenvolvimento do embrião, uma importante população celular de origem hematocitopoiética se destaca por cumprir funções vitais para o desenvolvimento embrionário, denominadas células Natural Killer uterinas (*uNK*).

As *uNK* são assim chamadas, pois apresentam características semelhantes às células natural killer periféricas (*pNK*), no entanto, são específicas do ambiente uterino pois exibem características peculiares como ausência de citotoxicidade e secreção de interferon-gamma (*INF- γ*), além de outros fatores que auxiliam na manutenção da homeostase uterina durante a gestação.

As *uNK* de camundongos proliferam a partir do quinto dia de gestação e se diferenciam em células grandes e com muitos grânulos citoplasmáticos, semelhantes às *NK* ativadas de outros órgãos. Estas células se distribuem no endométrio da região mesometrial desde regiões mais distantes (contendo preferencialmente *uNK* imaturas) até regiões mais próximas ao embrião (ricas em *uNK* diferenciadas e senescentes). Neste ambiente, podem ser encontrados quatro subtipos de *uNK* reativos para lectina DBA, único marcador seletivo para as *uNK* de camundongos, que caracterizam as formas de diferenciação das células *uNK*.

A eficiência na marcação das células *uNK*, com especificidade comparável à de um anticorpo, se deve a expressão de N-acetil-D-galactosamina apenas nas *NK* do útero durante a gestação de camundongos, não reagindo com células *NK* de outros órgãos ou outras espécies.

Como estas células correspondem a maior população leucocitária do útero de humanos e camundongos durante a gestação, e apresenta uma importância relevante na manutenção gestacional, estudos têm procurado investigar suas funções durante a gestação normal e alterada.

Apesar de todo conhecimento encontrado na literatura sobre exercício materno, interações com o sistema imune, fluxo sanguíneo materno em resposta ao exercício, células *uNK* e placenta de humanos e camundongos, não existiam relatos, até o presente estudo, do efeito do estresse induzido por exercício físico extenuante sobre a gestação de camundongos, sobretudo no que diz respeito à ação das células *uNK*..

Em função da necessidade de estudos nesta área, propusemos avaliar os efeitos do estresse induzido por exercício físico extenuante de natação, bem como, as possíveis alterações no útero por meio de estudos morfológicos, citoquímicos e estereológicos no 10º dia de gestação, utilizando o modelo experimental de camundongos.

Nossos resultados demonstraram que o exercício físico extenuante durante a gestação provoca complicações no ambiente uterino prenhe que levam a diminuição no peso materno, das taxas de implantação e viabilidade fetal, bem como aumentam a taxa de perda embrionária. Estes efeitos ocorrem concomitantemente ao expressivo aumento em número e indução da diferenciação das células *uNK*, sem provocar sinais morfológicos indicativos de sua citotoxicidade. No entanto, o exercício físico extenuante realizado anteriormente a gestação reduz significativamente esses efeitos, aumentando o peso materno, restabelecendo as taxas normais de implantação e o número total de células *uNK*, aumentando a viabilidade e diminuindo a perda fetal, contudo sem impedir por completo os efeitos deletérios do exercício físico e a aceleração da diferenciação de *uNK*.

Os achados deste estudo prospectivo caracterizam este modelo experimental de exercício físico extenuante como uma ferramenta que será útil para estudos futuros da investigação dos mecanismos neuroimunoendócrinos, envolvidos com parto prematuro e aborto causado por fatores estressores muitas vezes desconhecidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células Natural Killer Periféricas

As células natural killer periféricas (*pNK*) compreendem aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos do sangue periférico. Originam-se na medula óssea a partir de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺, (COLUCCI, *et al*, 2003). Sua denominação surgiu devido a sua habilidade em realizar citotoxicidade espontânea em células tumorais e células infectadas por patógenos a partir da liberação de seus grânulos contendo perforina e granzima, (MORETTA, 2006, SMYTH, 2005). Estudos sugerem que o desenvolvimento das células NK também ocorra em tecidos linfóides secundários e órgãos não linfóides, (FREUD, *et al*, 2006, VOSSHENRICH, *et al*, (2006).

As células NK foram originalmente descritas como uma população homogênea de linfócitos, (KIESSLING, 1975). Posteriormente foi caracterizado que as células NK do sangue periférico de humanos poderiam ser divididas em dois subtipos baseados na expressão de CD56 e CD16, (LANIER, 1986). O subtipo predominante no sangue periférico, correspondendo à aproximadamente 90% são as células CD56^{dim} CD16⁺, sendo conhecidas pela sua alta citotoxicidade e baixa secreção de INF- γ . Já as células CD56^{bright} CD16⁻, perfazem os outros 10% da população de células NK e são produtoras de muitas citocinas incluindo *INF- γ* , *TNF*, *IL-10*, *IL-13* e *GM-CSF* sob o estímulo de citocinas pró-inflamatórias, porém, podem adquirir citotoxicidade após ativação prolongada, (COOPER, *et al*, 2001).

Evidências atuais, mostraram que suas funções vão muito além da sua tradicional capacidade citotóxica. As células produzem citocinas que interagem diretamente com outras células do sistema imune, tais como as células dendríticas (CD), participando da regulação do sistema imune adaptativo, (SMYTH, 2005).

A ativação de células *NK* é regulada pela integração de sinais positivos e negativos. Os receptores mais caracterizados das NKs pertencem a super família de Ig em humanos (KIR), a família das lectinas em camundongos (LY49) e CD94/NKG2 em ambas as espécies.

Apesar de serem estruturalmente diferentes, essas famílias de receptores compartilham vias de transdução de sinal intracelular, (COLUCCI, *et al*, 2002). Os receptores

dessas famílias unem-se às moléculas da classe I do complexo maior de Histocompatibilidade (*MHC*) clássico e não clássico e os ligantes para estes receptores de ativação não são totalmente definidos, (LANIER, 2005, ORR e LANIER, 2010).

Os subtipos de NK do sangue periférico também diferem na expressão de receptores de quimiocinas. As células citotóxicas CD56^{dim} CD16⁺, expressam CXCR1 e CX3CR1 e respondem respectivamente a seus ligantes, *IL-8* e fractalcina, (CAMPBELL, 2001). Curiosamente, apenas as células NK que expressam CD56^{bright} em órgãos linfóides secundários armazenam os marcadores CD62L e CXCR3, o que resulta em um enriquecimento desse subtipo em órgãos linfóides secundários e locais de inflamação, (CAMPBELL, *et al*, 2001, FERLAZZO, *et al*, 2004).

As diferentes populações de células NK de humanos estão presentes em órgãos linfóides e não linfóides como nos linfonodos, timo, amígdalas, baço e útero, (VOSSHENRICH, *et al*, 2006, HANNA, *et al*, 2007).

Portanto, de acordo com seu papel na imunidade inata e na vigilância imunológica, as células *NK* são amplamente distribuídas em mamíferos, mas a distribuição de suas subpopulações é diferente entre locais anatômicos, sugerindo uma especialização de células *NK*, (TRINCHIERI, 1989, CAMPBELL, *et al*, 2001 e FERLAZZO, 2004).

Em humanos, as células CD56^{bright}CD16⁻ são mais numerosas nos órgãos linfóides secundários, sendo até 75% das células *NK* nos gânglios linfáticos e 50% no baço, (FERLAZZO, 2004). Como os linfonodos provavelmente abrigam 40% de todos os linfócitos humanos, e apenas 2% de todos os linfócitos circulantes são células CD56^{bright}CD16⁻, os órgãos linfóides secundários constituem um conjunto notável de células efetoras do sistema imune inato dos seres humanos. Em camundongos, a distribuição de células *NK* também é diferente, e os nodos linfáticos são enriquecidos por estas células, embora representem uma população menor no baço e sangue periférico, (HAYAKAWA, 2006, VOSSHENRICH, 2006).

A localização das células em regiões peri foliculares nos órgãos linfóides potencializam sua interação com células dendríticas (*DCs*) que chegam através de aferências linfáticas, (FERLAZZO, *et al*, 2004, BAJENOFF, *et al*, 2006 e GARROD, 2007). Experimentos utilizando a microscopia intra-vital em camundongos revelaram que as células *NK* se direcionam para os linfonodos e fazem contatos com as *Dcs*, (BAJENOF, *et al*, 2006 e GARROD, 2007).

A questão de haver ou não um desenvolvimento interligado dos subtipos de células *NK* é investigada há algum tempo e, recentemente vários estudos sugerem que as células $CD56^{bright}CD16^{-}$ são capazes de se diferenciar em $CD56^{dim}CD16^{+}$ sob ativação prolongada, (ROMAGNANI, *et al*, 2007, CHAN, *et al*, 2007).

Foram observadas diferenças funcionais entre os subtipos de célula *NK* humanos. As células $CD56^{bright}CD16^{-}$ expressa altos níveis de moléculas de adesão L-selectinas, o que implica na capacidade de migração destas células para órgãos linfóides secundários, bem como órgãos não linfóides. Isto pôde ser confirmado pela constatação de regiões altamente enriquecidas de células *NK* $CD56^{bright}$ em regiões de nodos linfáticos contendo células T, e também no útero de humanos e camundongos, (FEHNIGER, *et al*, 2003). No útero durante a gestação, as células *NK* regulam processos de desenvolvimento específicos da interface materno-fetal, (HANNA, *et al*, 2006, 2007).

Pode-se notar que estudos em camundongos e humanos, têm documentado a interação das células *DCs* com as células *NK*, no ambiente inflamatório e em tecidos linfóides secundários. Sendo esta interação crucial para ativação recíproca destas células, (FERLAZZO, *et al*, 2004). Além disso, as células *NK* possuem uma versatilidade funcional e em particular a secreção de citocinas através de sua ativação durante a resposta imune inata, com atenção ao *INF- γ* , uma importante citocina capaz de minimizar infecções e direcionar a resposta imune para promover uma proteção eficiente, (RAJ RAI *et al*, 2004).

2.2 Células natural Killer no Útero

No início da gestação, o útero se modifica para receber o embrião. Esta modificação ocorre entre as paredes musculares do útero a qual consiste de duas camadas de células, sendo uma camada interna circular e uma camada externa longitudinal que se estende até o mesométrio. Os vasos mesometriais formam numerosas ramificações quando chegam no útero formando uma área triangular (sob corte transversal), limitada por dois lados até a extensão longitudinal do mesométrio e um terceiro lado até a cobertura muscular circular do mesométrio, (SELYE, 1935). Na área delimitada por estes três lados, ocorrem importantes alterações em células de tecido conjuntivo propriamente dito, os fibroblastos endometriais, que se diferenciam em células com características epitelióides

que passam inclusive a se unirem por junções. Este fenômeno é denominado decidualização, (ABRAHAMSOHN, 1983). À decidualização atribuem-se funções de conter a invasividade trofoblástica, (BEVILAQUA *et al*, 1991, APLIN e GLASSER, 1994), manter a ancoragem do blastocisto no endométrio e promover a nutrição do embrião e produção de hormônios para a manutenção da gestação (ABRAHAMSOHN, 1983).

Nesta área triangular, concomitantemente à decidualização mesometrial, forma-se uma estrutura transitória que foi inicialmente e erroneamente caracterizada como glândula metrial. Esse erro na sua caracterização inicial ocorreu em função de seu estudo morfológico demonstrar células em microscopia fotônica com citoplasma repleto de grânulos PAS positivos, (SMITH, 1966; LARKIN e FLICKINGER, 1969; PEEL *et al.*, 1983). Em 1911, Ancel e Bouin, utilizaram o termo “glândula endócrina miometrial” para descrever esta estrutura que foi subseqüentemente chamada de “glândula metrial” por Selye e McKewon em 1935 e as células que a constituíam foram inicialmente denominadas células granulosas da glândula metrial (GMG), (PEEL S, 1989).

Ultraestruturalmente, os grânulos citoplasmáticos destas células são heterogêneos e eletrondensos, (LARKIN e FLICKINGER, 1969; DICKSON e BULMER, 1971; PAFFARO JR *et al*, 2003) com morfologias semelhantes aos grânulos das células NK ativadas de ratos, (BURKHARDT *et al.*, 1990). Além disso, estudos imunocitoquímicos e imunocitoquímicos com as GMG revelaram a presença de perforina nos grânulos intracitoplasmáticos destas células, (PARR *et al.*, 1987, 1990_a; ZHENG *et al.*, 1991), expressão de CD45 (REDLINE e LU, 1989; PARR *et al*, 1990_b), Thy-1 (BERNARD *et al*, 1978; MUKHTAR, STEWART e CROY, 1989; PARR *et al*, 1990_b) , asialo-GM1 (MUKHTAR, STEWART e CROY, 1989) e não expressão de marcadores de linfócitos T e B (WHITE-LAW e CROY, 1996). Após as observações da presença de perforina nos grânulos citoplasmáticos das células *uNK*, foi sugerido uma importância destas células nos fenômenos imunológicos da reprodução (PARR *et al.*, 1987, 1990_a ZHENG 1991).

Tais estudos foram fundamentais para caracterização destas células como células pertencem à linhagem NK e estas passaram a ser denominadas na literatura como células Natural killer uterinas (*uNK*).

A região da glândula metrial foi também renomeada. Croy (1999), sugeriu a denominação de agregado linfóide mesometrial da gestação (MLAp) a esta estrutura, constituído essencialmente por células natural killer uterinas, (CROY *et al*, 1997).

As células Natural Killer uterinas (*uNK*) fazem parte da população de células Natural Killer. Sua origem é hematopoiética, onde a linhagem precursora é a linfocitária, (ZENG, 1991, CROY, 1997a). Os progenitores das células NK (pro.NK) aparecem no fígado e timo fetal e neonatal, (AIBA, Y., AND M. *et al*, 1997, JALECO, A. *et al*, 1997, MICHIE, A *et al*, 2000). Em adultos a principal fonte é a medula óssea e o baço, (WILLIAMS, N. *et al*, 1998). A mobilização de linfócitos induzida pela gestação é primeiramente observada a partir de órgãos linfóides primários (medula óssea e timo), (MEDINA, K. *et al*, 1994, TIBBETTS, T *et al*, 1999), e órgãos linfóides secundários (baço e nodos linfáticos), (SASAKI, K., and ITO, 1980, HETHERINGTON e HUMBER, 1977).

Estudos, utilizando decidualização artificial, mostraram que a diferenciação das *uNK* é independente do embrião e da presença do trofoblasto, (PEEL S., *et al*, 1989, BANY e CROSS, 2006, HERINGTON J *et al*, 2009).

O início da resposta decidual se dá no útero de camundongos após a implantação do blastocisto no 4º dia de gestação (ddg). A implantação e a decidualização ocorrem no lado antimesometrial do útero. De uma maneira polarizada, as células trofoblásticas irão formar os primórdios da placenta, chamado de cone ectoplacental. Este crescerá em direção mesometrial para assim, alcançar o mesométrio, onde receberá o suprimento sanguíneo uterino, (CORRÊA DA SILVA, 1997).

De acordo com Corrêa da Silva (1997) a decidualização é acompanhada de alterações morfológicas nas células *uNK*, como aumento gradual do tamanho destas células e de seus grânulos que contêm mucinas, (KISO *et al*, 1992), perforina (PARR *et al*, 1990), serina estearase (ZHENG *et al*, 1991) e fosfatases (PEEL 1989).

A decidualização secundária ao redor do cone ectoplacental parece induzir a diferenciação das células *uNK* dentro da região da decídua basal (DB), (JIANHONG ZHANG *et al*, 2010).

As células *uNK* fazem-se presentes no útero de diversos animais como humanos e camundongos, (CROY *et al*, 1997), porcos (CROY *et al*, 1994), macacos (CARDELL *et al*, 1969) e hamsters (BULMER *et al*, 1983).

Foi observado, em humanos, por meio de estudos de imunofenotipagem, que as células *uNK* apresenta receptores à semelhança das células CD56^{bright}CD16⁻, a população minoritária de células NK da circulação periférica, (COOPER *et al*, 2001).

Em humanos, as células *uNK* são encontradas após a menarca durante o ciclo menstrual, predominantemente na fase lútea secretora tardia e são sustentadas pela ges-

tação na região decidual do útero, onde são muito proliferativas, (KING A., 2000 e LASH G.E, *et al*, 2010).

As células *NK* são detectadas no útero de camundongos de aproximadamente duas semanas após o nascimento por meio de imunohistoquímica, (KISO Y *et al*, 1992), precedendo as células T. Durante a puberdade, entre o quarto e quinto dias do ciclo estral, não há mudanças na localização ou no número relativo de células *uNK*, e células pequenas e agranulares foram consideradas como precursoras das *uNK* (pré-*uNK*), (JIANHONG ZHANG *et al*, 2010).

No estudo das *uNK*, Corrêa da Silva (1997), utilizou a citoquímica de lectina DBA (*Dolichos Biflorus Agglutinin*), que possui alta afinidade por glicoconjugados contendo N-acetil-D galactosamina presentes nas membranas celulares e ao redor dos grânulos das *uNK*. Paffaro Jr *et al* (2003), demonstraram que esta lectina possui especificidade na marcação das *uNK*, não reagindo com outras populações linfocitárias. Assim, distingui até mesmo as células *uNK* no 5º dg quando começam a apresentar modificações nos carboidratos que são reconhecidos pela lectina *Dolichos Biflorus agglutinin (DBA)*. Segundo os mesmos autores, a citoquímica de lectina DBA caracteriza quatro subtipos de células *uNK* a saber: O subtipo I de célula *uNK* seria a célula na sua forma mais imatura. Esses são esféricos, pequenos como os linfócitos circulantes, medindo aproximadamente $9 \pm 3 \mu\text{m}$ de diâmetro e desprovidos de grânulos, poucas organelas, com núcleo circular com grande quantidade de cromatina condensada e fortemente positivos para lectina DBA em sua superfície. O subtipo II de *uNK* são maiores, com $13 \pm 2 \mu\text{m}$ de diâmetro, positivos em sua superfície à lectina DBA com poucos grânulos lisossomo secretores citoplasmáticos também apresentando reatividade a lectina DBA. Possui núcleo com uma cromatina mais condensada, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi evidentes. O subtipo III, a forma caracterizada como plenamente diferenciada e ativa, são ainda maiores, medindo $26 \mu\text{m}$, com núcleo redondo eucromático, muitos grânulos densos, com forte reatividade à lectina DBA em sua superfície e grânulos. O subtipo IV, a forma senescente, possui diâmetro de $30 \mu\text{m}$, com inúmeros grânulos positivos à lectina DBA, áreas citoplasmáticas eletrólucidas, provavelmente devido a extração do glicogênio, núcleo apresentando uma massa de cromatina condensada e irregular semelhante às células em apoptose, com vacúolos citoplasmáticos e reatividade descontínua da membrana celular para lectina DBA.

2.3 uNK Endometriais e uNK Deciduais

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 deciduais (*dNK*) ; (HO *et al*, 1996; HANNA *et al*, 2006; MANASTER E 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 E MANDELBOIM, 2010).

As células *eNK* de humanos correspondem a cerca de 30% dos leucócitos do útero humano durante o ciclo menstrual, (HO *et al*, 1996; LACHAPELLE *et al*, 1996). Estas células foram extensamente estudadas por anos, e estudos imunocitoquímicos mostram que o número absoluto de *eNK* aumenta muito da fase proliferativa para fase secretória do ciclo menstrual, (MANASTER *et al*, 2008), proliferando neste período, como comprovado pela expressão de Ki67 nestas células, (PACE *et al*, 1989).

Apesar de exaustivamente estudadas, poucos estudos caracterizaram o fenótipo das células *eNK*. Eriksson *et al* (2004) demonstraram que se por um lado as *eNK* expressam CD56, CD57, CD94 e CD16; por outro expressam receptores do tipo *KIR* semelhantes às células *CD56^{dim}*, como CD58b e NKB1, além de não expressarem L-selectina em suas membranas.

Estas células expressam marcadores de ativação HLA-DR e CD69, (HO *et al*, 1996. MANASTER E MANDELBOIM, 2010, investigaram recentemente o padrão de expressão dos receptores de ativação de *NK* nas células *eNK* a partir de biópsias de tecidos endometriais humanas. Estes autores demonstraram que as células *eNK* não expressam CD16, mas expressam altos níveis de *pNK46* e *NKG2D*, à exemplo das células *dNK*. Todavia, em contraste com as *dNK*, as *eNK* também não expressam *pNK30* e *pNK44*. Estes autores sugeriram que a ausência de *pNK30* e *pNK44* poderia ser o resultado da ativação de receptores nas *eNK* sustentada por ligantes não conhecidos, os quais são expressos nos tecidos, (MANASTER *et al*, 2008). Este repertório de ativação incomum e outros marcadores de superfície celular, faz das *eNK* de humanos única entre outros subtipos de *NK* conhecidos, (MANASTER *et al*, 2008).

As células *dNK* de humanos, correspondem, diferente de outros tecidos, a cerca de 50 a 70% dos leucócitos dos 40% de células imunes encontrados na interface materno-fetal, (WHITELAW e CROY, 1996).

O número de células decíduais é mais alto no primeiro trimestre de gestação, declinando ao longo do segundo trimestre, (TABIASCO *et al*, 2006). Assim como em camundongos apenas poucas células *uNK* são encontradas na decídua humana a termo, (CROY *et al*, 2006). A maioria das células *dNK* de humanos são CD56^{bright}CD16⁻ (MANASTER E MANDELBOIM, 2010) e expressam CD94/NKG2 (TRUNDLEY *et al*, 2004), o oposto às células *dNK* de camundongos que expressam altos níveis de CD16. (YADI *et al*, 2008). No entanto, semelhante às *eNK*, as *dNK* lembram as células NK CD56^{dim}CD16⁺, expressando receptores *KIR* e quanto ao conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos, (HIBY *et al*, 2008).

As *dNK* expressam vários receptores de ativação como, *pNK46*, *pNK30*, *pNK44*, NKG2D e 2B4 (VACCA *et al*, 2006; KOPCOW *et al*, 2005), em contraste com as células *eNK* de humanos que não expressam *pNK30* e *pNK44* (MANASTER *et al*, 2010). Além disso, as *dNK* expressam CD69, um marcador de ativação de NK (EI COSTA *et al*, 2008).

A expressão de receptores inibitórios de NK nas *dNK* como NKG2A, KIR2DL4, KIR2DL1, KIR2DL2/L3 e ILT-2 pode ser responsável pela ausência de citotoxicidade destas células, por meio de interações destes receptores com moléculas *HLA-G* e *HLA-E* do complexo principal de histocompatibilidade não clássico, (KING *et al*, 2000 e EI COSTA *et al*, 2008).

Embora o repertório de receptores das células *dNK* esteja bem definido, e existam comprovações da existência de diferentes subtipos de *uNK* em humanos, os mecanismos que controlam o acúmulo e diferenciação das células *dNK* estão sendo investigados. É possível que as *dNK* sejam recrutadas de outros órgãos ou do sangue periférico para a decídua, onde são submetidas a diferenciação local específica causada por *TgF-β* e outros fatores locais, (KESKIN *et al*, 2007), o que é reforçado por estudos realizados nas *dNK* de camundongos, (CHANTAKRU *et al*, 2001). Alternativamente, as *dNK* originadas de progenitores hematocitopoiético, porém residentes do endométrio, podem proliferar e diferenciar localmente no início da gestação (LYNCH *et al*, 2009), o que concorda com dados obtidos após transplante de endométrio humano para camundongos NOD/SCID/ γ c^{-null} (T⁻, B⁻, NK⁻) onde foi observada grande quantidade de *dNK* CD56⁺ que é expresso em

humanos e não em camundongos. É possível ainda que as células *eNK* residentes no tecido uterino humano, (MANASTER, *et al*, 2008; VERMA, *et al*, 2000) e de camundongos, (MALLIDI *et al*, 2009), sob estímulo do novo ambiente criado pela gestação, se diferenciem em *dNK*.

Estrategicamente, tem sido realizados em célula *uNK*, vários estudos da expressão de receptores comumente encontrados em células Natural Killer de outros ambientes, dentre eles estão os *KIR* de humanos, os Ly49 de camundongos e os CD94/NKG2 expressos em ambas as espécies (COLUCCI *et al*, 2002).

No entanto, não existem ainda descritos na literatura anticorpos capazes de identificar especificamente as células *uNK* de camundongos, ao contrário do que ocorre em humanos, onde anticorpos anti-CD56 são amplamente utilizados para o estudo das *uNK*, (COLUCCI *et al*, 2002).

Sendo assim, a maioria dos estudos em camundongos antes de 1995, reconheciam as células *uNK* por meio de sua forma linfóide e reatividade de seus grânulos utilizando o reagente ácido periódico de Schiff (*PAS*), um marcador histoquímico para glicoproteínas, especialmente mucinas, (VISHWANATH *et al*, 1984).

Nos últimos dez anos, os investigadores das células *uNK* têm utilizado a lectina *DBA* para identificação seletiva destas células como preconizado por Paffaro Jr *et al* (2003), devido ao fato da reação positiva para esta lectina distinguir melhor as *uNK* que a reação de *PAS* em cortes histológicos, além deste reagente ser útil para o isolamento celular e isolamento de *RNA* após as células serem coletadas dos tecidos por meio da microdissecção a laser, (TAYADE *et al*, 2005; JIANHONG ZHANG *et al*, 2010).

Estudo recente realizado por Croy *et al* (2010), no qual foi realizada a reação de *PAS* concomitantemente à reação de lectina *DBA* demonstrou que 90% das células *uNK* de camundongos por volta do 10.5-12.5 ddg foram reativas para estas duas técnicas (*PAS⁺DBA⁺*) e os 10% restantes reativos apenas para *PAS* (*PAS⁺DBA⁻*), sugerindo a existência de dois subtipos diferentes de células *uNK* em camundongos. Interessantemente, os mesmos autores relataram que após camundongos transgênicos alinfóides (*Rag2^{-/-}*, *IL2rg^{-/-}*, *N⁻T⁻B⁻*) receberem medula óssea de camundongos normais, as células *PAS⁺DBA⁻* constituíam menos de 1% da população de *uNK*, sugerindo, portanto que as células *uNK* *PAS⁺DBA⁺* têm precursores circulantes e que as *uNK* *PAS⁺DBA⁻* possam surgir de precursores intra-uterinos.

Yadi *et al* (2008), também identificaram dois subtipos de células no útero de camundongos no período médio da gestação (10^o ddg), utilizando citometria de fluxo a partir de suspensões de células decíduais ricas em células *NK* CD3⁻CD122⁺. Neste estudo, foram observadas células *NK* com menor diâmetro e com fenótipo de células *NK* periféricas (NK1.1⁺ ou DX5⁺), e células grandes que exibiam o fenótipo NKp 46⁺, Ly49⁺, NK1.1⁻ no camundongo, ZANG *et al*, (2009), revelaram que as células *NK* lectina DBA⁺ e lectina DBA⁻ são funcionalmente diferentes na sua produção de citocinas e fatores angiogênicos.

Recentemente, foi sugerido por Blasius *et al* (2007), que as *NK* de camundongos com o fenótipo B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ seriam as análogas às *NK* CD56⁺ de humanos. Em um estudo recente, desenvolvidos por Mallidi *et al* (2009), examinou o fenótipo das células *eNK* e demonstrou que estas expressam B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺, de maneira similar ao observado em células *NK* do sangue e do baço de camundongos.

Além disso, apenas as *dNK* expressam receptores Ly49, bem como, CD69 e KLRG 1 que são considerados marcadores da ativação e proliferação de *NK* respectivamente, (HUNTINGTON *et al*, 2007).

Dessa maneira, a exemplo do que ocorre em humanos, em camundongos parecem existir pelo menos dois subtipos diferentes fenotipicamente de *uNK*, as células *NK* endometriais (*eNK*) de origem intra-uterina e as células *NK* decíduais *dNK*, com origem periférica. No entanto os dados na literatura a respeito das *eNK* de camundongos são ainda muito recentes e limitados.

Assim, provavelmente, as células *dNK* podem constituir uma população heterogênia que engloba todos os tipos presentes no útero gravídico de humanos e camundongos, (MANASTER E MANDELBOIM *et al*, 2010).

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.

2.4 Funções da células *NK* uterinas

Estudos das células *uNK* da decídua de humanos revelaram que, embora estas células estejam em íntimo contato com o trofoblasto, não desempenham sua função citotóxica contra estas células embrionárias, (KING *et al*, 2000).

Muitos estudos demonstram que a atividade citotóxica das *uNK* é reduzida comparada com células NK do sangue periférico, (Vacca *et al*, 2006; King *et al*, 2000), embora as *uNK* expressem vários receptores de ativação, bem como níveis elevados de perforina, granzima A e B, (KOOPMAN *et al*, 2003; VACCA *et al*, 2006).

Embora a citotoxicidade das *uNK* seja baixa, ela não é inexistente, visto que os receptores NKp46 (porém não os NKp30) destas células induzem a mobilização do cálcio intracelular, polarização da perforina, exocitose e desencadeia a apoptose em células alvo. É possível que este potencial citotóxico das *uNK* seja importante em casos de infecção, (EL COSTA *et al*, 2008).

O mecanismo pelo qual as células *uNK* da decídua não tem seu potencial citotóxico ativado ainda permanece por ser esclarecido. Neste sentido várias hipóteses tem sido propostas para este fenômeno.

Primeiramente, a ausência de citotoxicidade de *uNK* pode ser o resultado das interações inibitórias entre as moléculas do MHC não clássicas *HLA-G* e *HLA-E* e os receptores inibitórios expressos por estas células como ILT-2, KIR2DL4 e CD94/NKG2A, (EL COSTA *et al*, 2008; KING *et al*, 2000). No entanto, o ILT-2 é expresso apenas por cerca de 20% das células *uNK* e existem controvérsias a respeito do potencial do KIR2DL4 das *uNK* em se ligar ao *HLA-G* para inibir sua citotoxicidade.

Kopcow *et al* (2005) propuseram uma nova hipótese, na qual as células *uNK* seriam incapazes de formar sinapses maduras para mobilizar perforina. Este não deve ser o único mecanismo para a inibição da citotoxicidade de *uNK*, já que estas células exibem citotoxicidade por meio da utilização de NKp46.

Outra possibilidade foi postulada por Vacca *et al* (2006). De acordo com estes autores a citotoxicidade de *uNK* pode ser inibida pelo receptor 2B4, que desencadeia sinais inibitórios que estão relacionados à ausência ou baixa expressão de proteínas sinalizadoras associadas à ativação de linfócitos (SAP) pelas *uNK*.

Ou seja, a atividade citotóxica de *uNK*, talvez seja exercida por estas células apenas em situações na qual a homeostase gestacional seja rompida como por exemplo em situações de infecções por vírus e bactérias. Na inexistência destas situações, as interações das *uNK* com células imunológicas e não imunológicas na sua redondeza inibem radicalmente sua citotoxicidade, (MANASTER E MANDELBOIM, 2010).

De fato, as células *uNK* são as maiores produtoras de fatores de crescimento angiogênicos da oitava a décima semana de gestação. E entre a décima segunda e décima

quarta semanas são as maiores produtoras de citocinas. Um desbalanço nestes mecanismos, ainda não conhecidos plenamente, pode contribuir para complicações durante a gestação levando a perda gestacional, (LASH *et al*, 2010).

Os mecanismos de perda gestacional mediados pelo sistema imune são pouco conhecidos. Em mulheres com aborto recorrente, há aumento no número e ativação das células periféricas CD56⁺, o que sugere um importante papel do sistema imune, (LAIRD *et al*, 2003). Os estudos com roedores sugerem que as maiores causas de perda gestacional de origem imunológica estejam na interface materno-fetal, (BILINSKI *et al*, 2008).

Entre as citocinas da interface materno-fetal, a *IL-10*, anti-inflamatória, parece ser especial, por apresentar um papel importante na gestação através da sua relação com outros moduladores intra-uterinos e sua alta atividade imunossupressora (MOORE *et al*, 2001). Foi observado por Hanna *et al* (2000), que a expressão de *IL-10* pela placenta humana é dependente da idade gestacional com significativa expressão no segundo trimestre.

Estudos realizados por PLEVYAK *et al* (2002), demonstraram que a expressão de *IL-10* na decídua e na placenta era muito pequena em mulheres com aborto espontâneo, partos pré-termos e pré-eclampsia. Entretanto os mecanismos pelos quais a *IL-10* protege o feto não foram explicados.

Reforçando a importância desta citocina para a gestação, Murphy *et al* (2009), em seus estudos utilizando camundongo nocaute para *IL-10* (*IL-10*^{-/-}) submetidos à baixas doses de LPS, notaram que a sepse provocou aumento vigoroso da citotoxicidade e invasividade das células *uNK* dentro da zona placentar, levando a morte fetal ou restrição do crescimento intra-uterino de maneira independente dos níveis de progesterona. Além disso, os mesmos autores revelaram que a imunodepleção das células *uNK*, ou administração de *IL-10* ou tratamento com anti-*TNF-α* Ab, reverteu estes defeitos induzidos pelo LPS na gestação. Esses resultados mostram uma relação crucial das células *uNK* e *IL-10* na prevenção da inflamação e a participação de distúrbios nesta relação como indutores do parto prematuro e do aborto espontâneo de uma maneira independente de progesterona.

No entanto, sabe-se que os efeitos imunomodulatórios da progesterona são determinados pela disponibilidade do hormônio e pela sensibilidade dos linfócitos, que produzem, por meio da ativação via progesterona uma proteína chamada fator bloqueador induzido pela progesterona (*PIBF*), (SZEKERES-BARTHO, 1985a). Embora relativamente

baixa, as concentrações de progesterona são suficientes para inibir a atividade das NK periféricas durante a gestação normal, (SZEKERES-BARTHO, 1985b). Concentrações baixas de *PIBF* encontradas na urina foram relacionados a pré-eclampsia, (POLGÁR *et al*, 2004). Tanto a progesterona quanto a *PIBF* inibem a exocitose de perforina e diminuem a citotoxicidade dos linfócitos decíduais, (LASKARIN *et al*, 2002). Anticorpo anti-*PIBF* reverteu a redução da citotoxicidade mediada pela progesterona de linfócitos CD56⁺/*PIBF*⁺ decíduais, (FAUST *et al*, 1999). Estes achados sugerem que *PIBF* poderia mediar os efeitos da progesterona na regulação da atividade citolítica dos linfócitos decíduais na interface materno-fetal.

ROMAN (2001), estabeleceu um modelo experimental de camundongos, no qual foi procedida a lesão embrionária com o objetivo de verificar se a morte de um embrião seria capaz de estimular a citotoxicidade das células *uNK*. Durante este estudo foi constatada intensa reabsorção embrionária caracterizando a perda fetal neste modelo. Quanto às células *uNK*, estas exibiam alterações na marcação dos grânulos citoplasmáticos que contêm perforinas, granzimas e outras enzimas líticas após citotoxicidade de lectina *DBA*, sugerindo a desgranulação de seu conteúdo, pressupondo uma resposta uterina às células trofoblásticas gigantes que poderiam ter a atividade invasiva alterada ou descontrolada após a lesão do embrião. Além disso, 2 a 3 horas após a lesão, a reatividade para lectina *DBA* dos grânulos e superfície das *uNK* era restaurada. Esta constatação comprova que as células *uNK*, após a sua ativação com perda do conteúdo granular, não morrem ou degeneram-se à semelhança do que é descrito para as células *NK* periféricas, (WHITELAW e CROY, 1996).

Sendo assim, são fragmentados e não conclusivos o conjunto de resultados a respeito da citotoxicidade das células *uNK* e a participação deste fenômeno nos casos de perda gestacional. Por outro lado, parece claro que o micro ambiente uterino durante a gestação, estimula as células *uNK* a exercerem suas funções.

Apesar dos primeiros estudos investigativos da função das células *uNK* se basearem na possibilidade das *uNK* regularem a invasão trofoblástica por meio da citotoxicidade (CROY, 1994), Ashkar e Croy (1999, 2001), em seus experimentos com camundongos estabeleceram um novo conceito a respeito da função das células *uNK* na manutenção da homeostasia gestacional. Em seus estudos, estes autores demonstraram que a ausência das *NK* na decídua de camundongos transgênico, resultava em sítios de implantação anormais e inadequado remodelamento das artérias espiraladas da placenta que nu-

trem o embrião. Todavia, mostraram que esta anormalidade se devia a ausência de interferon-gamma (*INF-γ*) derivado das *uNK*, o qual regula positivamente o diâmetro do lúmen das artérias espiraladas durante a decidualização.

Além do *INF-γ*, as *uNK* de camundongos também secretam fator estimulador de colônias-1 (*CSF-1*), *IL-1*, fator inibitório de leucemia (*LIF*), (CROY *et al*, 1991), fator de necrose tumoral (*TNF-α*) e *VEGF*, (LASH *et al*, 2006).

El Costa *et al* (2008), demonstraram que após a ativação das *uNK* de humanos com *IL-2* e *IL-15* por 48 horas, estas foram induzidas a secretarem *TNF-α*, *MIP1-α*, *MIP1-β*, *CSF* e *INF-α*. Outros estudos demonstraram que quando as *uNK* humanas são estimuladas por *IL-15* secretam *IL-8* e *IP-10*, citocinas que ligam em receptores nas células trofoblásticas invasivas, levando a migração do trofoblasto, (HANNA *et al*, 2006). Adicionalmente, a expressão de metaloproteinases 7 e 9 pelas células *uNK* e pelos macrófagos que infiltram dentro do músculo liso vascular das artérias espiraladas é considerada importante para a iniciação do remodelamento das artérias pelo trofoblasto (SMITH *et al*, 2009).

As células *uNK* de humanos, como as de camundongos, podem produzir uma variedade de fatores angiogênicos, como vários membros da família *VEGF*, *PLGF*, angiopoetina-2 (*Ang-2*) e *NKG5*, (HANNA *et al*, 2006).

Estudos recentes *in vitro* demonstraram que os clones de *uNK* que expressavam receptores de ativação *KIR2DS4* secretaram mais *IL-8*, *IP-10*, *VEGF*, que os clone que expressavam receptores inibitórios *KIR2DL1*, sugerindo, que a ativação das *uNK* reduz o risco de pré-eclampsia, através da produção suficiente de fatores de crescimento e quimiocinas, (HANNA *et al*, 2006).

Estudos conduzidos por Hiby *et al* (2004), indicaram que a forte inibição das células *uNK*, como resultado da interação entre receptores *KIR* destas células com receptores *HLA-C* no trofoblasto extraviloso, aumentou a probabilidade de pré-eclampsia. Por outro lado, as interações entre *KIR* e *HLA-C* capazes de induzir a ativação das *uNK*, resultaram em uma melhor invasão dos trofoblastos.

O conjunto de resultados encontrados na literatura e a grande habilidade das células *uNK* em secretarem muitas citocinas para apoiar os processos de desenvolvimento da gestação, é indicativo de que estas células são mais ativadas que inibidas no útero de roedores e seres humanos durante a gestação, (MANASTER E MANDELBOIM, 2010). No entanto, em situações normais a ativação destas células desencadeia respos-

tas não-citotóxicas, que caracterizam as *uNK* como as maiores reguladoras do remodelamento vascular e da manutenção da homeostase durante os estágios iniciais da gestação.

2.5 Exercício Físico, Estresse e Gestação

Existem vários fatores que podem influenciar no desenvolvimento e crescimento fetal, dentre eles estão fatores maternos, placentários e fetais, (MOTTOLA,1996).

Em teoria, há potenciais riscos para o feto durante a realização de exercícios maternos. O feto pode ser negativamente afetado por diversas respostas físicas maternas incluindo, a contratilidade uterina através do aumento de hormônio liberados, hipertermia, hipoglicemia fetal secundária ao aumento da utilização de glicose materna e diminuição do fluxo sanguíneo útero-placentar, (BONEN *et al*, 1992, SPINNEWIJN *et al*, 1996, KENNELLY *et al*, 2002). Há pouca informação acerca dos mecanismos pelos quais estes e outros fatores são influenciados durante exercícios extenuantes comprometendo o bem-estar fetal.

Segundo Vorher (1982), fatores maternos como fluxo sanguíneo uteroplacentário, trocas de oxigênio e nutrientes, temperatura corporal materna e hidratação podem ser influenciados por fatores extrínsecos. Dentre estes fatores, o exercício físico pode ser considerado importante influenciador nas respostas fisiológicas, (MOTTOLA,1996, WOLFE, 1989, 1994).

Em um clássico estudo realizado por Lotgering *et al* (1983), foi encontrado que o fluxo sanguíneo uteroplacentário é inversamente proporcional a intensidade e duração do exercício. Foi observada uma diminuição de 13% no fluxo sanguíneo uterino durante 10 minutos de exercício agudo até 70% do VO_2 máximo (max.) e um declínio de 17% até 10 minutos de exercício com 100% do VO_2 max. Assim, foi sugerido que a resistência vascular uterina poderia aumentar até 65% durante o exercício. Este fato está relacionado com o aumento de noradrenalina na circulação materna, alterando o fluxo sanguíneo durante o exercício agudo, levando a vasoconstrição uteroplacentário, (PALMER *et al*, 1984).

A diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário durante o exercício, não é vista somente como inversamente proporcional à intensidade do exercício materno, mas também como uma forte relação dose-resposta, Jones *et al* (1990), mediram a intensidade do exercício a valores de até 60%, 70%, 80% e 90% do VO_2 max. e

encontraram diminuições no fluxo sanguíneo materno de 29%, 45% 62% e 80% respectivamente. Neste sentido, com o aumento da intensidade do exercício, há mais sangue desviado a partir do útero e outros órgãos para os músculos em trabalho. Este fato poderia sugerir que a oxigenação fetal estaria em risco durante exercícios de alta intensidade, (PALMER, 1984).

O exercício regular durante a gestação, parece melhorar a capacidade física da gestante, mas as evidências são insuficientes para inferir importantes riscos ou benefícios para a mãe e o feto, (KRAMER e MAC DONALD, 2006).

Pouco é conhecido sobre os efeitos da atividade física sobre a fertilidade na população, em contraste com os benefícios bem elucidados da atividade física regular na saúde geral, incluindo a prevenção de doenças, (WARBURTON *et al*, 2006).

Rich-Edwards *et al* (2002), mostraram que mais horas de exercício vigoroso, foi associado com redução do risco de infertilidade ovulatória. Enquanto que Morris *et al* (2006), observaram que as mulheres que se inscreveram em um programa de tratamento de fertilidade e relataram se exercitar 4 horas ou mais por semana, durante 1 a 9 anos antes do início do tratamento, tinham 40% menos chances de ter filhos, três vezes mais probabilidade de sofrer alterações no ciclo menstrual e duas vezes mais probabilidades de ter falhas na implantação e perda da gravidez que mulheres que relataram não se exercitar. Já o exercício moderado, associado a perda de peso, foi positivo no tratamento de fertilidade de mulheres obesas, (CLARK *et al*, 1995).

Outros fatores importantes relacionam-se as respostas induzidas pelo estresse, como as respostas neuro-hormonais, com subsequente ativação do sistema nervoso simpático, sendo que este atua sobre os órgãos linfóides, podendo regular as respostas do sistema imune através de secreções catecolaminérgicas locais e sistêmicas, (CADOPPO, 1998).

O ambiente gestacional é caracterizado pelo aumento da função do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal e aumentos progressivos dos hormônios do estresse, cortisol e *ACTH* após 12 semanas de gestação. O momento e o local de liberação destes hormônios nos tecidos periféricos são determinantes para a manutenção e desenvolvimento fetal, (PRIOR, 2005, BURTON *et al*, 2007).

Os aumentos circulatórios de cortisol e *ACTH* podem interferir no tempo de ovulação e encurtar a fase lútea, causando diminuição da disponibilidade da

progesterona e assim dificultar o sucesso implantacional onde a espessura endometrial deve ser ≥ 8 mm, (SELYE, 1939).

As perdas reprodutivas que vão desde falhas na implantação a abortos, e que são puramente biológicas e que podem ser prevenidas, são cada vez mais evidentes, e, tem sido levantada a hipótese de que a exposição ao estresse ambiental e psicossocial pode levar ao fracasso gestacional, (NAKAMURA *et al*, 2008).

O termo estresse está baseado em experimentos de Hans Selye, (1936), onde descreveu a Síndrome Geral da Adaptação. Esta síndrome representava uma reação geral e inespecífica a estímulos aversivos ou a situações desconhecidas, cuja finalidade seria a manutenção da homeostasia e adaptação do organismo à nova condição. Posteriormente propôs o termo estresse, (TANNO E MARCONDES, 2002).

Mason (1968), mostrou que a resposta do organismo frente a estímulos aversivos tinha um caráter específico, variando de acordo com o tipo, intensidade e duração do estímulo estressor, e com as características individuais. Outros estudos confirmaram estes achados e mostraram que experiências previamente vivenciadas pelo indivíduo também têm significativa influência nas respostas fisiológicas a estímulos estressores, (LEVINE, 2000; STAM *et al*, 2000).

A reação de estresse pode ser dividida em três fases. A fase de alarme ou excitação, que ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, e é caracterizada por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor, com ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), resultando em aumento na secreção de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) e de glicocorticóides. Se o estímulo for mantido, a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos durante a fase seguinte, denominada fase de resistência. Quando essa adaptação não ocorre, desenvolve-se a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se suscetível a distúrbios renais, cardiovasculares, gastrintestinais e imunológicos, (LUNDBERG, 2000; McEWEN, 2003).

Em 1939, Selye inaugurou o que se tornou um enorme campo de pesquisa sobre o estresse, através da demonstração de que o exercício físico, uma dieta insuficiente e outros agentes poderiam induzir atrofia ovariana e hipertrofia da adrenal.

A resposta biológica ao estresse é conhecida como supressora da função reprodutiva. Um exemplo é a frequência de exercício de alta intensidade em atletas adolescentes acarretando atraso na menarca e amenorréia hipotalâmica, (FRISCH *et al*, 1974).

Recentemente, foi sugerido que o exercício não tem efeitos supressivos nas funções reprodutivas e sim age indiretamente, aumentando o gasto energético e diminuindo a disponibilidade calórica, (LOUCKS *et al*, 1998, WILLIAMS *et al*, 2001). Segundo estes autores, durante o treinamento físico, a função reprodutiva não é interrompida pelo exercício, mas sim pela baixa disponibilidade de energia, definida como consumo de energia através da dieta e gasto energético pelo exercício. Assim, mesmo quando são realizados exercícios extenuantes, a suplementação alimentar previne perturbações da função reprodutora, segundo estes autores.

No entanto, evidências sugerem que a exposição ao estresse causa efeitos adversos na mãe e no feto e seu impacto depende de respostas fisiológicas multivariadas e multidimensionais. Estas respostas incluem efeitos diretos nos hormônios gestacionais, ativação do sistema simpático e do eixo HHA, assim como efeitos diretos no balanço imune, (DOUGLAS, 2010). O pico de secreção de glicocorticóides ocorre após 15 a 30 minutos da exposição ao estresse e atua via receptores para mineralocorticóides e glicocorticóides, sendo que estes controlam a disponibilidade de glicose para os tecidos, bem como a maturação e o desenvolvimento celular, (DOUGLAS, 2010).

A gestação está associada com aumentos nos níveis de substâncias vasoativas que incluem prostaglandinas, *VEGF*, óxido nítrico e produtos do sistema renina-angiotensina, sendo este o principal regulador da função hemodinâmica. Embora a homeostasia cardiovascular seja mantida durante a gestação, os mecanismos regulatórios são alterados ocorrendo aumento da ativação do sistema renina-angiotensina, devido a expansão do volume sanguíneo. Todavia os vasos se tornam insensíveis aos seus produtos, por mecanismos ainda não conhecidos, (YUNOHARA *et al*, 1994).

Foi recentemente mostrado que as células *pNK* e T de humanos respondem a angiotensina II através de proliferação e produção de citocinas como *IFN-γ*. Estas células eram CD56⁺ e expressaram além dos receptores AT1 e AT2, todos os componentes do sistema renina-angiotensina (renina, angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina, (JUREWICZ *et al*, 2007). Hatta (2009), demonstrou a presença de receptores de angiotensina do tipo 1 e 2 nas células *uNK* de camundongos e sugeriu um papel regulador na vasoconstrição e vasodilatação.

Estudos demonstraram que o estresse aumenta os sítios de ligação para angiotensina II através de aumentos desse peptídeo na circulação, assim como de glicocorticóides (CASTREN e SAAVEDRA, 1988). A ativação desses receptores resulta na síntese e

secreção aumentadas de *CRH*, *ACTH* e corticosterona (SAAVEDRA *et al*, 2004), sendo que estes atuam de maneira direta e indireta na gestação.

O estresse gestacional tem sido associado a gestações mais curtas e diminuição do peso fetal, sendo este relacionado com aumentos dos níveis de *ACTH* e cortisol que pode amplificar a liberação de *CRH* placentar e aumentar a atividade do eixo HHA fetal, (MICHEL FERIN, 2006.). O estresse na forma de retenção (WIEBOLD *et al*, 1986) ou através do som (JOACHIM *et al*, 2003), induziu aborto em camundongos prenhes, por redução dos níveis de progesterona, assim como a redução da expressão de seus receptores na interface materno-fetal, (BLOIS *et al*, 2004).

Níveis adequados de progesterona conferem resistência ao estresse durante a gestação, por exercer resposta anti-abortiva através da ligação ao seu receptor nos linfócitos o qual induz a liberação de *PIBF*, que inibe a exocitose de perforina e diminui a citotoxicidade dos linfócitos decíduais, (LASKARIN *et al*, 2002, JOACHIM *et al*, 2003, ARCK *et al*, 2007).

A tolerância imune materna no início da gestação envolve adaptações seletivas para prevenir a rejeição das células trofoblásticas semi-alógenas, a qual inclui a presença de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$, expressão do fator de crescimento transformador- $\beta 1$ (*TGF- $\beta 1$*), bem como o balanço nos níveis de citocinas Th2 (*IL10*, *IL4*, *LIF*) e Th1 (*IL 12*, *IL6*, *TNF α* , *IFN γ*), (DOUGLAS, 2010a, DOUGLAS 2010b, BLOIS *et al*, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que o exercício induz consideráveis mudanças fisiológicas no sistema imune, e interações entre o estresse do exercício e o sistema imune oferece a oportunidade de relacionar a fisiologia básica e a clínica, e avaliar o papel do estresse subjacente aos mecanismos imunofisiológicos, (BENTE KLARLUND e LAURIE HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Neste sentido, o exercício representa um modelo confiável de estresse físico, sendo que muitos fatores estressores clínicos, tais como, cirurgias, traumas e sepse, induzem um padrão de respostas hormonais e imunológicas semelhantes às do exercício, (HOFFMAN-GOETZ L e PEDERSEN, 1994).

Vários tipos, intensidades e durações de exercícios induzem o recrutamento de células *pNK*, mas após exercícios de longa duração, a concentração de células *pNK* e a atividade citolítica parecem diminuir, (PEDERSEN e ULLUM, 1994). A atividade das células *pNK* é aumentada quando mensurada imediatamente após ou durante o exercício moderado e intenso. Sabe-se também que a intensidade mais que a duração do exercí-

cio é responsável pelo incremento no número de células *NK*. (BENTE KLARLUND PEDERSEN e ADAM STEENSBERG, 2002). As células *NK* contêm muitos receptores adrenérgicos, sendo mais responsivas ao exercício e outros estressores que qualquer outra subpopulação de linfócitos, (BENTE KLARLUND e LAURIE HOFFMAN-GOETZ, 2000). A adrenalina também pode ser responsável pelo recrutamento das células *NK* para o sangue durante o estresse por exercício físico. Este fato é aceito porque os receptores β -adrenérgicos são aumentados nas células *NK* durante o exercício físico e o agonista do receptor β -2 induziu o recrutamento das células a partir dos vasos, linfonodos, baço e intestinos, (BENTE KLARLUND e LAURIE HOFFMAN-GOETZ, 2000)..

Apesar de não encontrarmos até o momento nenhuma referência na literatura no que diz respeito ao possível efeito estressor do exercício físico sobre as células *uNK* de humanos e camundongos durante a gestação, sabe-se que condições maternas adversas podem levar a profundas alterações no desenvolvimento e programação fetal, levando a perdas gestacionais, baixo peso ao nascimento, maior susceptibilidade a doenças na vida adulta, como depressão, obesidade e complicações cardiovasculares, (MATTHEWS *et al*, 2010, MEANEY, 2010).

Portanto, os estudos da fisiologia da reprodução e programação fetal, podem ser ampliados e corroborados por meio da análise dos efeitos estressores do exercício físico durante a gestação, iniciado com estabelecimento do modelo descrito nesta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Gerail

Avaliar os efeitos do estresse induzido por dois programas de exercício físico extenuante de natação em camundongos prenhes, bem como, as possíveis alterações no útero por meio de estudos citoquímicos, morfológicos estereológicos.

3. 2 Objetivos Específicos

Analisar os efeitos do estresse induzido por exercício físico extenuante na taxa de implantação, viabilidade fetal e perda embrionária de camundongos.

Analisar os efeitos do exercício físico extenuante nas células *uNK* e na sua reatividade para lectina *DBA*.

Quantificar o total e os 4 subtipos característicos da diferenciação das *uNK* em 3 domínios heterogêneos dos sítios de implantação durante a prenhez de camundongos submetidos ao exercício físico extenuante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* do Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em um ciclo de 12/12 horas claro e escuro, com água e ração a vontade. As fêmeas foram acasaladas com machos da mesma linhagem e quando constatada a presença da rolha vaginal, foi considerado como 1º dia de gestação (ddg). Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Unifal-MG.

4.2 Programa de Treinamento

Os 30 animais prenhes foram divididos em três grupos e pesados no 1º, 4º, 7º e 10º dia de gestação (ddg). Os treinamentos foram realizados no final do ciclo escuro em sistema de natação modificado de Vieira *et al* 1988 com água a uma temperatura de 30°C. Uma caixa de polipropileno nas medidas de 30 X 25 X 16 cm, foi dividida ao meio por uma parede de acrílico e mantida sob agitação com o auxílio de jatos de ar para formação de bolhas a fim de manter os animais nadando ininterruptamente (figura 1).

4.2.1 Grupo Controle

Os animais (N=10) foram acasalados e mantidos em condições normais (sedentários) até o 10º dia de gestação. (grupo1)

4.2.2- Grupo de Treinamento Durante a Gestação

Os animais (N=10) foram acasalados e a partir do 1º ddg, foram submetidos a uma condição de estresse induzida por exercício físico extenuante da seguinte maneira:

Do 1º ao 6º ddg os animais realizaram diariamente 60 minutos de natação sendo utilizado em dias alternados um halter (adicionado à cauda) com 4% da massa corporal do camundongo, durante os últimos 20 minutos do exercício. Do 6º ao 10º ddg, a massa

do halter foi aumentada para 10% da massa corporal do camundongo, nos últimos 20 minutos de exercício. (grupo 2).

4.2.3- Grupo de Treinamento Antes e Durante a Gestação

Os animais (N=10) foram submetidos a um programa de três semanas de treinamento como se segue:

Na primeira semana os animais realizaram o exercício de natação durante cinco dias por 15 minutos no aparato de natação supracitado. Na segunda semana, o treinamento foi incrementado de 10 minutos ao dia até alcançar um total de 60 minutos por dia. Na terceira semana os animais nadaram 60 minutos por dia. Após este período de adaptação ao treinamento, os animais foram acasalados e quando constatada a presença da rolha vaginal, foi considerado como 1º dia de gestação. A partir do 1º ddg os animais foram submetidos as mesmas condições de estresse do grupos G1 até o 10º dg, sendo:

Do 1º ao 6º ddg os animais realizaram diariamente 60 minutos de natação sendo utilizado em dias alternados um halter (adicionado à cauda) com 4% da massa corporal do camundongo, durante os últimos 20 minutos do exercício. Do 6º ao 10º ddg, a massa do halter foi aumentada para 10% da massa corporal do camundongo, nos últimos 20 minutos de exercício. (grupo 3)

Ao 10º ddg, todos os animais dos três grupos foram anestesiados com solução contendo 0,07 mL para cada 10g-animal de Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Tiasina e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH = 7,4, lentamente objetivando a fixação do tecido. Foram retirados os úteros e ovários para avaliação das taxas de implantação, viabilidade fetal e perda embrionária.

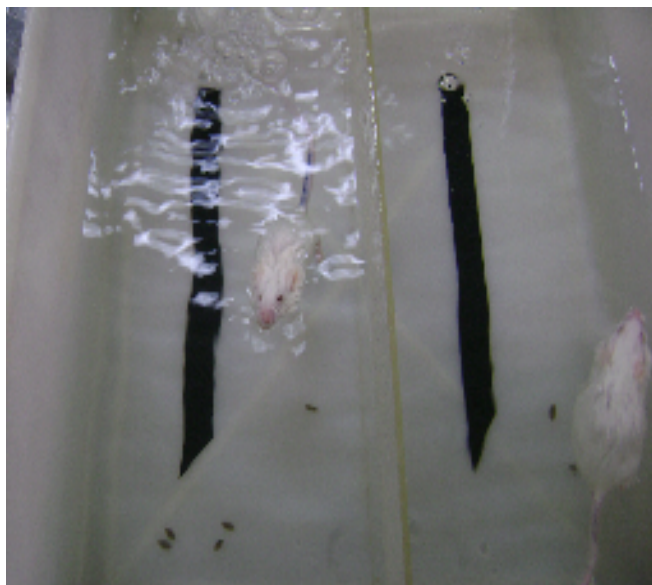


FIGURA 1: Aparato para realização dos exercícios de natação.

4.3 Análise das Taxas de Implantação, Viabilidade e Perda Embrionária

Para essa análise foi realizada a quantificação dos corpos lúteos e dos sítios de implantação de todos os animais utilizados.

Para o cálculo da taxa de implantação (I), o número de corpos lúteos (NL), encontrados em microscópio estereoscópico, foi comparado ao número de sítios de implantações totais (ST) encontrados nos cornos uterinos.

O ST foi igual a soma dos sítios de implantações viáveis (SV) com os sítios em aparente reabsorção (SR) e a taxa de implantação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = \frac{SV + SR \times 100}{NL}$$

A porcentagem de embriões viáveis (V) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula :

$$V = \frac{SV \times 100}{NL}$$

A porcentagem de perda embrionária (P) foi também analisada e calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$P = \frac{SR \times 100}{NL}$$

4.4 Processamento para Embebição em Parafina

Após a perfusão, foram coletados os sítios de implantação embrionária de todos os animais. Estes espécimes foram desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol para embebição em parafina. Foram obtidos cortes histológicos dos blocos de parafina com espessura de 7µm e estes foram montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina a 10%. Os cortes histológicos foram submetidos a 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 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 o 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 H₂O₂ (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*) (250 μ L) + *PBS* 0,05M pH 7,4 (2250 μ L) + H₂O₂ 30 vols. (20 μ L)
- 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*).

4.6 Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica

As análises estereológicas foram realizadas em cortes histológicos de sítios de implantação submetidos à reação de citoquímica de lectina *DBA*.

4.6.1 Amostragem

A amostragem para análise estereológica foi constituída de 3 cortes obtidos de 3 sítios de implantação distintos, procedentes de cada um dos 10 animais de cada grupo.

4.6.2 Estudo Estereológico

Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste (AT=30x10³ μ m²) para o total de células *uNK* e para cada um dos quatro subtipos distintos de *uNK* localizados em 3 áreas (Figura 2) do sítio de implantação embrionário onde se distribuem estas células a saber: Área 1: Próxima do miométrio da região mesométrio; Área 2: No endométrio entre o miométrio e o embrião implantado e; Área 3: No endométrio próximo ao embrião (Paffaro *et al*, 2003). A área teste foi delimitada por meio de um sistema teste quadrático que possuía duas linhas de exclusão e assim, foram contadas apenas as células encontradas na área teste que exibiram o núcleo nos cortes observados, exceto aquelas que tocaram as duas linhas de exclusão do sistema teste.

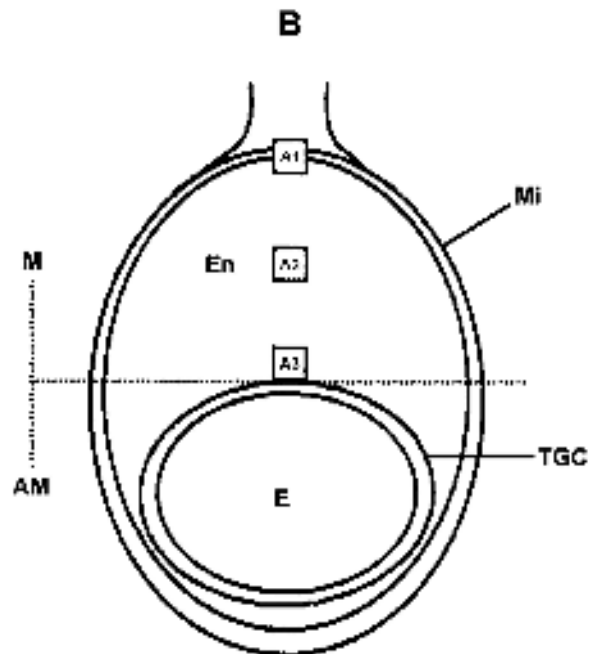


FIGURA 2: Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10º ddg e áreas 1 (R1), 2 (R2) e 3 (R3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células *uNK*. M, Região mesometrial; AM, região antimesometrial; Mi, Miométrio; En, Endométrio; TGC, células trofoblásticas gigantes; E, Embrião.

Fonte: Modificado de Paffaro Jr *et al*, 2003.

4.7 Análise Estatística

O experimento foi conduzido por delineamento inteiramente casualizado (DIC). A análise das taxas de implantação, viabilidade e reabsorção embrionária foi conduzida por ANAVA seguida de teste de *Tukey* para comparações múltiplas. A contagem celular por área, subtipo e grupos seguiu análise não-paramétrica por modelo linear generalizado (*GLM, General Linear Model*), sendo aceito como significativo p-valor de 0,05. Os procedimentos foram conduzidos por auxílio do pacote estatístico de domínio público R (*R, Development Core Team, 2009.*)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as análises morfológicas macroscópicas do útero de camundongos realizadas em nossos estudos, foi notado que os animais controles (grupo 1) apresentavam úteros com os dois cornos contendo em média $12 \pm 1,3$ sítios de implantação embrionária. Nestes animais os sítios de implantação tinham aspecto normal e sem sinais de hemorragia em seu interior (Figura 3a). Em contrapartida, nos animais do grupo 2, submetidos a exercício físico extenuante após o diagnóstico da prenhez, foi observado um menor número de sítios de implantação ($6 \pm 1,5$) comparando com o controle. Estes sítios de implantação eram aparentemente maiores que os do grupo controle e tinham coloração escura que sugeria fortemente a ocorrência de hemorragia local (Figura 3b). No grupo 3, por sua vez, foi notado um número maior de sítios de implantação comparado com o grupo 2 ($10 \pm 1,3$), muitos destes sítios eram maiores que os dos controles, outros eram menores e muitos deles apresentavam coloração escura, característico da hemorragia (Figura 3c).

Durante o estudo da morfologia macroscópica dos úteros e ovários dos 3 três grupos estudados foram adicionalmente avaliadas as taxas de implantação, viabilidade e perda embrionária por meio da observação e contagem dos sítios de implantação embrionária e corpos lúteos. Os resultados obtidos com estas análises mostraram que a taxa de implantação embrionária foi significativamente menor ($p < 0,001$) no grupo 2 ($62,8\% \pm 3,5$) quando comparado com o controle ($100\% \pm 0,0$) e o grupo 3 ($97,3\% \pm 1,1$) (figura 4)

A menor taxa de implantação e o aspecto morfológico dos sítios de implantação dos animais do grupo submetido ao exercício apenas durante a gestação (grupo 2) corrobora os achados de Morris *et al* (2006), que observaram que as mulheres que se exercitavam 4 horas ou mais por semana, tinham duas vezes mais probabilidades de ter falhas na implantação e perda da gravidez quando comparado a mulheres que relataram não se exercitaram. Embora não existam na literatura relatos da queda na implantação embrionária ocasionada por estresse físico, Hoffman *et al* (1984), observaram uma queda na taxa de implantação em coelhos, com ocorrência de 86% de morte embrionária após tratamento com dexametasona em concentração comparável com os altos índices de corticosterona que são observados em situações de estresse.

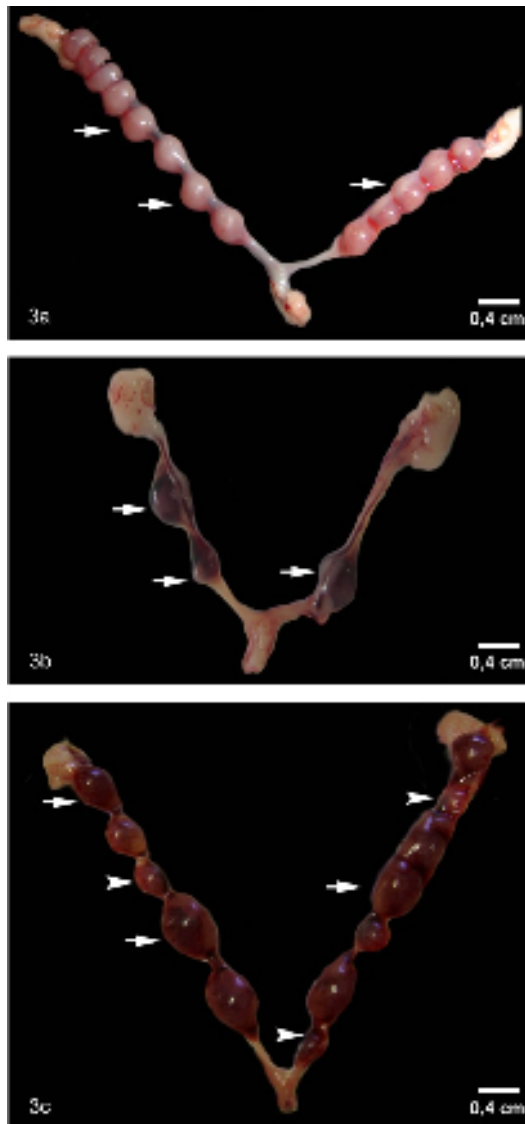


FIGURA 3: Imagens macroscópicas de úteros de camundongos no 10^o dg. (a) Sítios de implantação do grupo 1. Observar o aspecto normal destes sítios (Setas), sem sinais de hemorragia ou comprometimento da viabilidade dos embriões. (b) Sítios de implantação do grupo 2. Notar os sítios de implantação em menor quantidade neste animal (setas), mostrando provável reabsorção embrionária e sinais de hemorragia. (c) Sítios de implantação do grupo 3. Observar a maior quantidade de sítios de implantação em relação ao animal do grupo 2, porém com a presença sítios com sinais de hemorragia (setas) e com embriões em provável reabsorção (cabeças de seta).

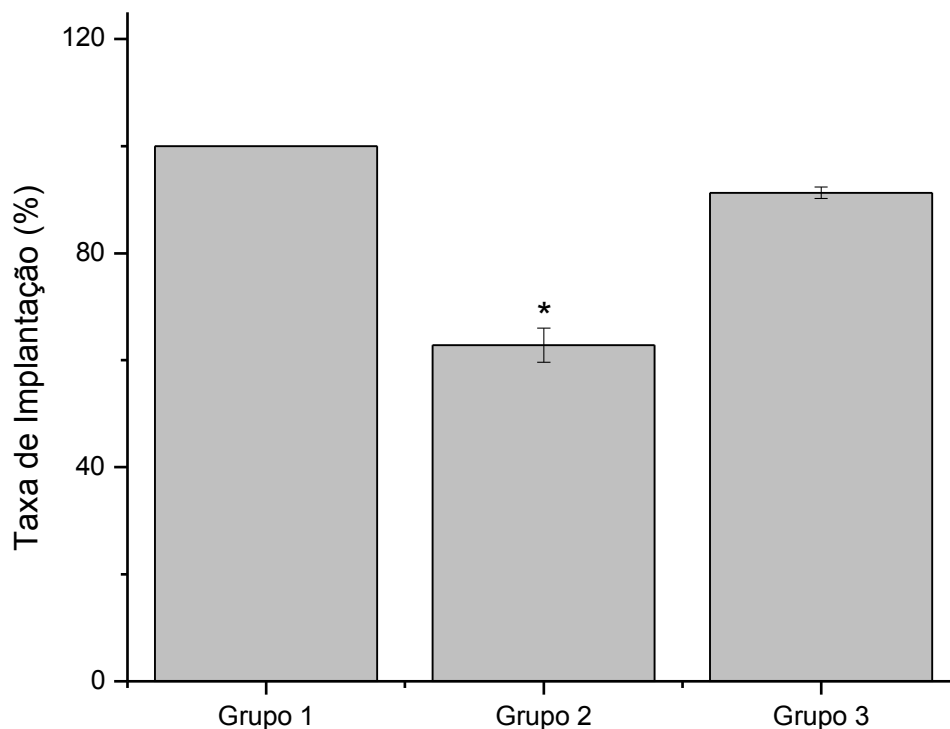


FIGURA 4: Média \pm DP das taxas de implantação dos animais submetidos aos treinamento e controle. * Diferença significativa $p < 0,05$.

Observando-se as características dos modelos de estresse e a natureza das comparações, os camundongos submetidos ao exercício antes e depois do diagnóstico da prenhez (grupo 3) apresentaram maiores taxas de implantação que o grupo submetido ao estresse apenas durante a gestação. De fato, a taxa de implantação no grupo 3 não foi estaticamente diferente do grupo controle. Tal fato poderia ser explicado pelas adaptações fisiológicas induzidas pelo exercício, tais como aumento do condicionamento muscular, condicionamento cardiovascular e adaptação ao estresse que seriam importantes para o sucesso da implantação.

A existência desta adaptação pôde também ser observada após a pesagem a partir do 1º dg dos animais dos 3 grupos analisados em nossos estudos (Figura 5). O peso dos animais do grupo 2 diminuiu significativamente do 1º para o 4º dg e manteve-se menor em comparação com os pesos dos animais do grupo 1 e 3 até o 10º dg ($p < 0,001$).

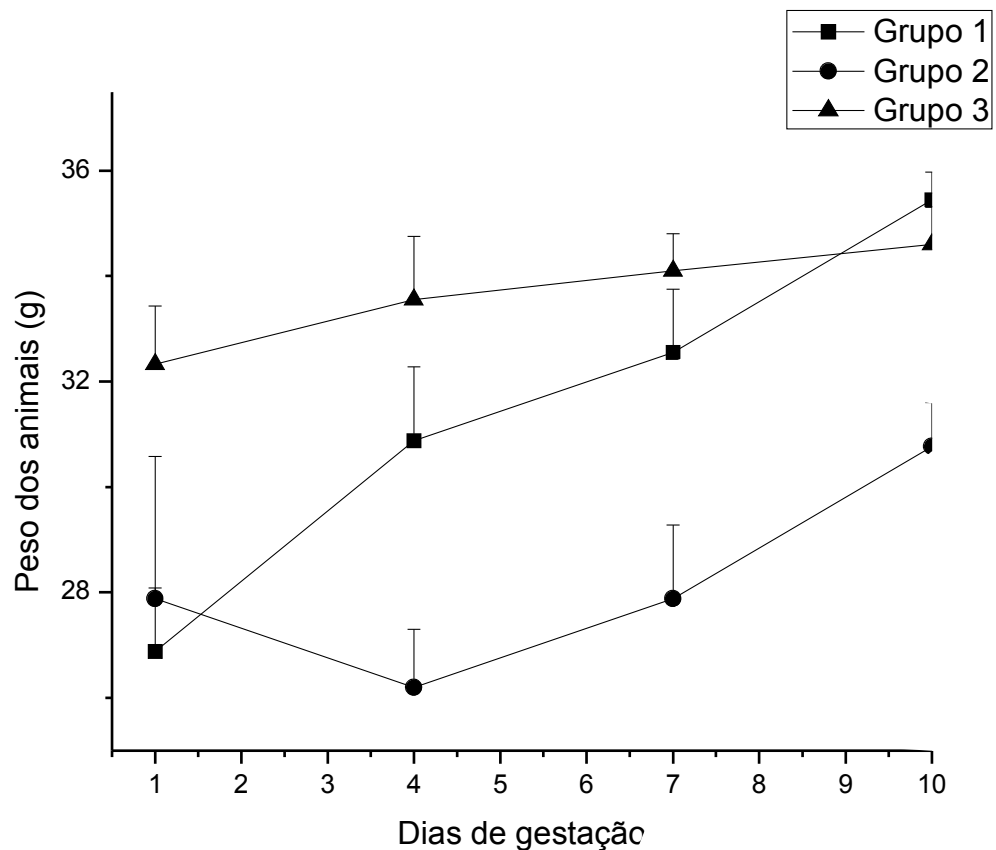


FIGURA 5: Relação do peso dos animais de acordo com o dia de gestação Média \pm SD dos grupos 1, 2 e 3.

Interessantemente o grupo 3, que realizou três semanas de exercícios antes de engravidar, apresentou no 1º dg valores de peso maiores ($p < 0,001$) que o controle (grupo 1). As três semanas de exercícios a que os animais do grupo 3 foram submetidos anteriormente ao diagnóstico da prenhez justificam este incremento no peso, podendo este ser concomitante ao aumento de massa muscular e/ou aumento da procura pelo alimento. No entanto, a prenhez nestes animais do grupo 3, causou uma estabilização no peso dos mesmos até o 10º dg e com a observação adicional de uma tendência a perder peso nestes animais.

A prática de exercício físico extenuante, associada à perda de peso, leva a supressão da secreção pulsátil de *GnRH*, ocasionando alterações no ciclo menstrual (DOLORES, 2001) e atrofia do interstício ovariano (SELYE, 1939). Além disso, sabe-se que é necessária uma quantidade mínima de gordura para manter as produções hormonais, e uma perda de peso de forma abrupta, não existindo o fenômeno de

adaptação, pode comprometer a manutenção dos níveis adequados de estrogênio e progesterona, (SELYE, 1939).

Assim, nossos resultados sugerem que o estresse induzido pelo exercício físico extenuante alterou a capacidade de manutenção do peso dos animais, o que pode ter diminuído a disponibilidade de glicose para o feto e prejudicado a síntese de hormônios necessários para a gestação normal.

Sabe-se que o fluxo sanguíneo uteroplacentário é inversamente proporcional a intensidade e duração do exercício, (LOTGERING *et al*, 1983). Assim, foi sugerido que a resistência vascular uterina poderia aumentar em até 65% durante o exercício. Este fato está relacionado com o aumento da catecolamina noradrenalina na circulação materna, alterando o fluxo sanguíneo durante o exercício agudo, levando a vasoconstrição uteroplacentário, (PALMER *et al*, 1984). Estes dados poderiam justificar a menor taxa de viabilidade embrionária dos grupos submetidos aos exercícios (figura 6). Em especial ao grupo 2, que foi submetido ao estresse físico somente durante a gestação, e apresentou a menor taxa de viabilidade ($74,3\% \pm 1,6$). O grupo 2, portanto, pode ter sofrido uma maior influência dos fatores relacionados ao estresse, como aumento de cortisol e catecolaminas que podem ter alterado a oferta de oxigênio e nutrientes, dificultando a capacidade de manutenção dos embriões.

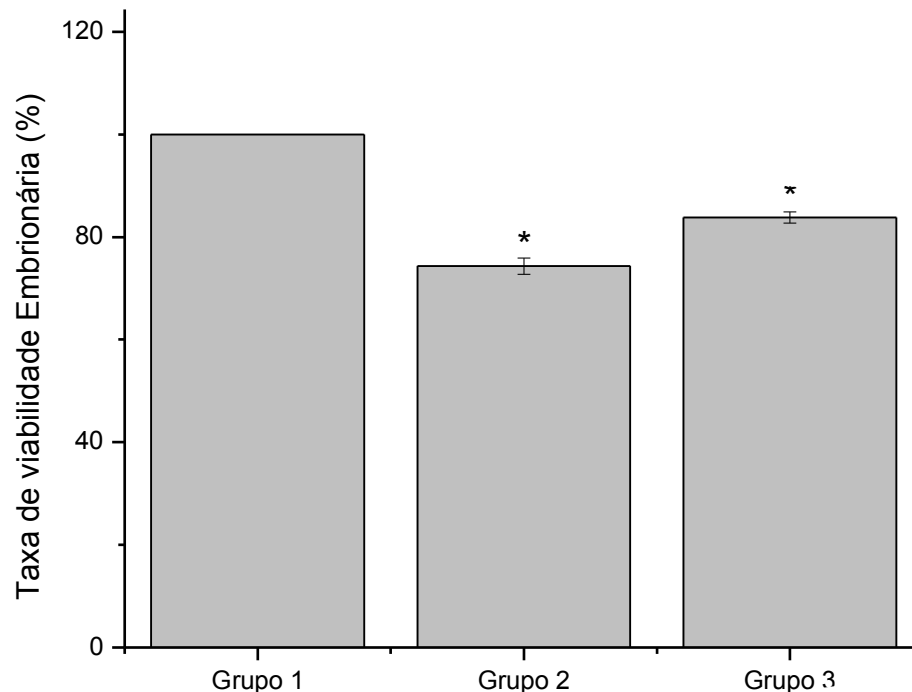


FIGURA 6: Percentual das taxas de viabilidade embrionária. Média \pm DP dos sítios viáveis. * Diferença significativa $p < 0,05$.

Quando avaliado o percentual de perda embrionária em nossos estudos (figura 7), foi observada o maior percentual de perda ($41,6 \% \pm 2,7$) nos animais do grupo 2 ($p < 0,001$) em comparação com o controle, o qual não apresentou perda, embora os animais do grupo 3 também apresentassem perda embrionária significativa ($23,6 \pm 1,6$) comparado ao controle ($p < 0,05$).

Portanto, após a análise do grupo 3, foi notado que os camundongos pertencentes a este grupo apresentaram melhores condições de manutenção dos embriões em relação aos animais do grupo 2 ($p < 0,001$), o que novamente, sugere que os animais do grupo 3 sofreram modificações dependentes do exercício físico realizado anteriormente à gestação que o adaptaram a resistir ao estresse quando prenhes.

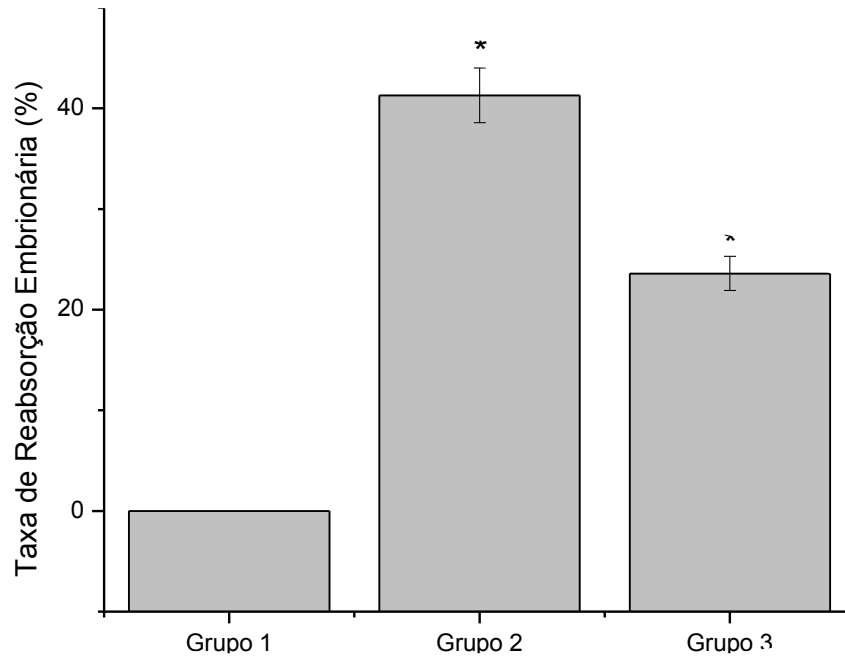


FIGURA 7: Percentual de reabsorção embrionária. Média \pm DP do total de perda embrionária. * Diferença significativa $p < 0,05$.

Contrastando com estes resultados e justificando a diferença de intensidade de exercício e o papel do estresse como influenciador das funções fisiológicas, um estudo realizado por William *et al* (1987), utilizando camundongos *Swiss*, mostrou que o exercício moderado realizado durante seis semanas antes do acasalamento seguindo até o décimo nono dia de gestação, não alterou as taxas de implantação, reabsorção e peso fetal.

Durante a observação em microscopia fotônica dos cortes histológicos dos sítios de implantação de animais dos grupos 2 e 3, a perda embrionária e a ocorrência de hemorragia foram confirmadas em todos os sítios de aparência hemorrágica quando comparados com os sítios de implantação de animais controle (Figura 8a, 8b e 8c). Estes resultados sugerem a ocorrência de alterações induzidas pelo estresse do exercício físico

extenuante que provocaram desequilíbrio na interface materno-fetal dificultando a manutenção dos embriões.

Em todos os sítios de implantação embrionária dos animais do grupo G2 nos quais não foi constatada reabsorção embrionária macroscopicamente e microscopicamente, para nossa surpresa, foi observada a placenta muito desenvolvida, contendo suas 3 camadas, o labirintotrofoblasto, espongiotrofoblasto e a camada de células trofoblásticas gigantes (Figura 9a, 9b, e 9c). O aspecto destes sítios com placenta já diferenciada lembrava o dos sítios de implantação de camundongos normais no 13º ddg (dados não mostrados). Este aspecto de gestação adiantada não foi observado nos animais do Grupo G1 (figura 8a), G3 ou nos sítios de implantação com reabsorção embrionária dos animais do grupo G2.

Após citoquímica de lectina *DBA* nos cortes histológicos de sítios de implantação de todos os animais analisados, foi possível identificar as células *uNK* com seus grânulos e superfície reativos para esta lectina. Além disso, não foram observadas diferenças no padrão de reatividade para lectina *DBA* nas células *uNK* dos animais dos 3 grupos. Este fato permitiu a identificação e quantificação segura, mesmo nos sítios de implantação dos animais dos grupos G2 e G3, dos quatro subtipos que caracterizam estágios da diferenciação das *uNK* de camundongos prenhes (Figuras 10a, 10b e 10c e 10d), a exemplo do encontrado em útero de todas as linhagens de camundongos normais (PAFFARO JR *et al*, 2003).

Por meio do estudo estereológico, realizando a quantificação dos subtipos de células *uNK* reativos para lectina *DBA*, foi inicialmente possível notar que houve diferença no número total de células *uNK* nos sítios de implantação dos grupos estudados. O grupo 2, que foi submetido ao exercício extenuante apenas durante a gestação, apresentou a maior população de células *uNK* (30/AT) ($p < 0,001$) quando comparado com os grupos 1 (17/AT) e 3 (19/AT), sendo que estes últimos não apresentaram diferenças significativas no número total de *uNK* (Figura 11). Estes dados sugerem que o estresse induzido por exercício físico extenuante durante a gestação foi capaz de estimular o recrutamento e/ou proliferação das células *uNK* no grupo 2. As *uNK* nestes animais podem estar aumentadas em número em resposta à diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacental durante o exercício de alta intensidade, que compromete a oxigenação do embrião (PALMER, 1984).

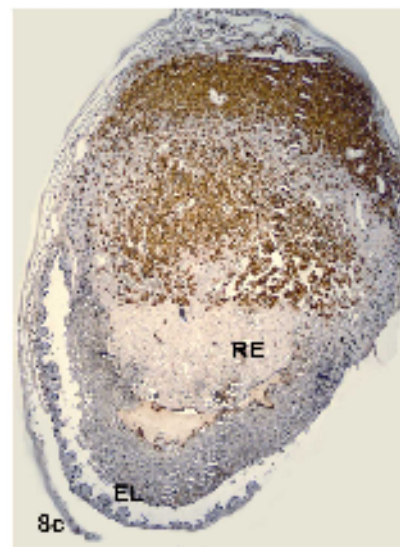
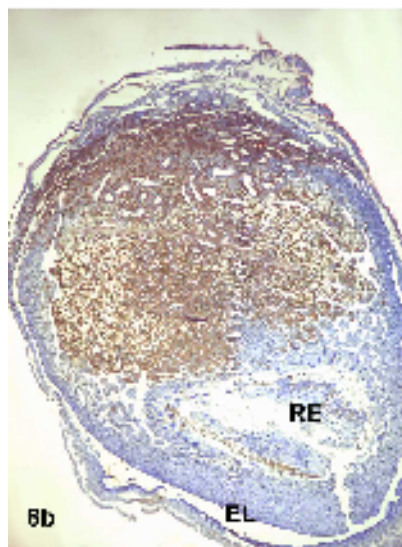
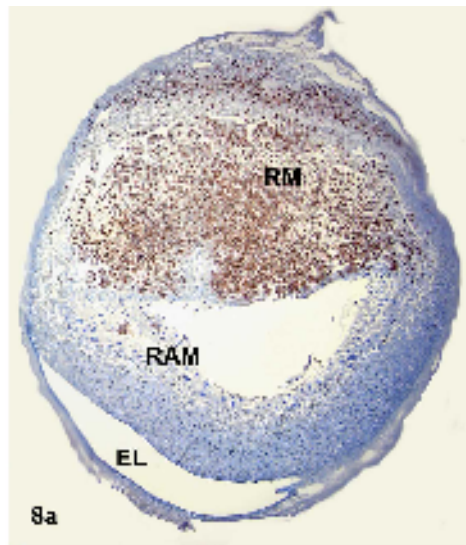


FIGURA 8: Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 10º dg. a. Exemplo de sítio de implantação do grupo controle (grupo 1). Notar as células *uNK* coradas em castanho. b e c) exemplos respectivamente de sítios de implantação do grupo 2 e 3. Observar as células *uNK* de coloração castanha, o aparente maior número destas células e o local de reabsorção embrionária (RE) nos dois cortes histológicos. M. Miométrio; En. Endométrio; RM. Região Mesometrial; RAM. Região Antimesometrial; EL. Epitélio Luminal uterino. Lectina DBA-peroxidase/hematoxilina.

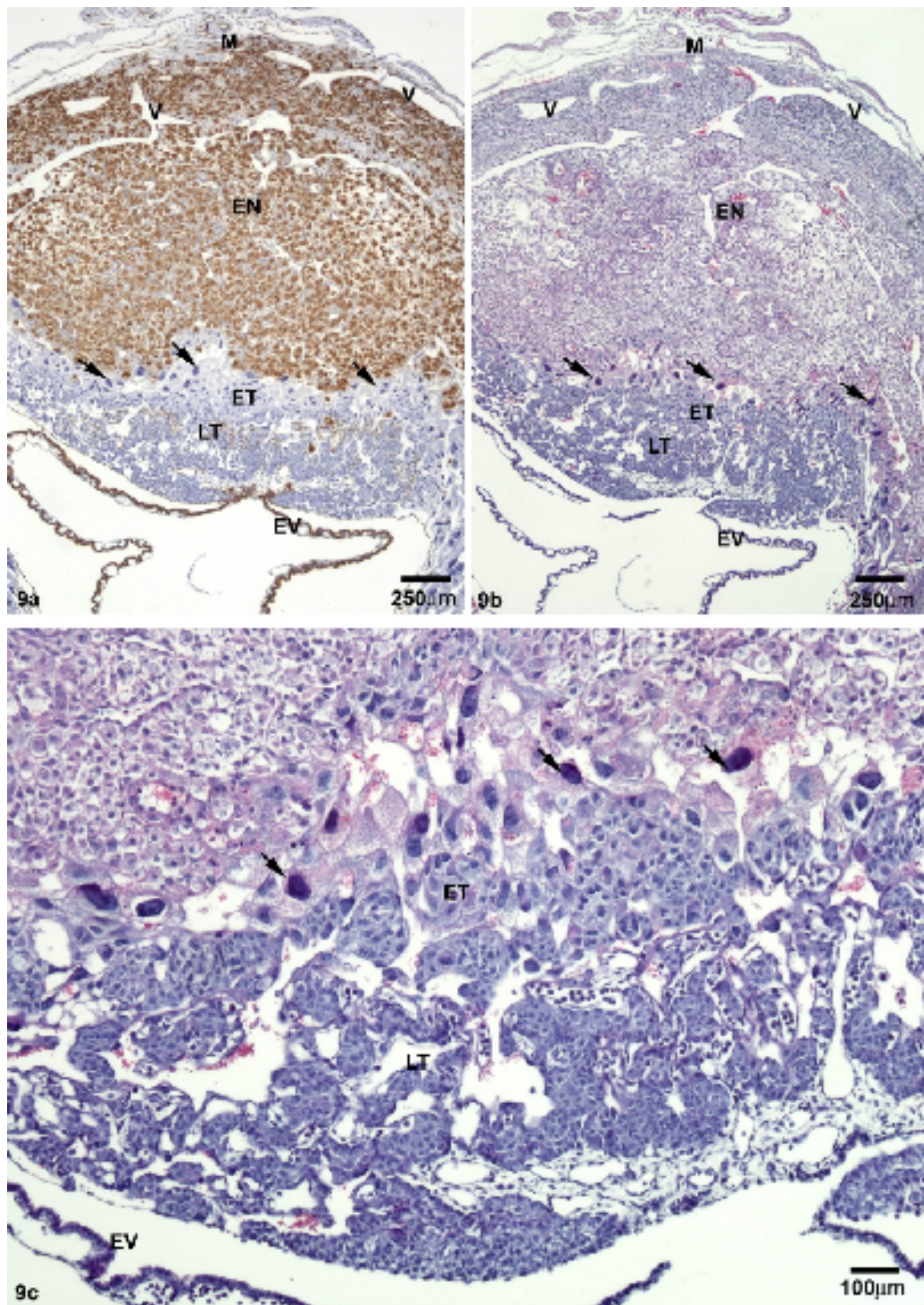


FIGURA 9: Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos do grupo 2 no 10^o dg. a) Corte histológico submetido a citoquímica de lectina DBA mostrando as células *uNK* coradas em castanho. b) Corte histológico do mesmo sítio de implantação mostrado em a, submetido a coloração de hematoxilina e eosina. c) Detalhe do mesmo corte histológico mostrado em b. Observar a placenta apresentando as camadas de células trofoblásticas gigantes (setas), espongiotrofoblasto (ET) e labitintotrofoblasto (LT), indicando um adiantamento na diferenciação da placenta neste animal. V. Vasos sanguíneos. EV. Endoderma visceral.

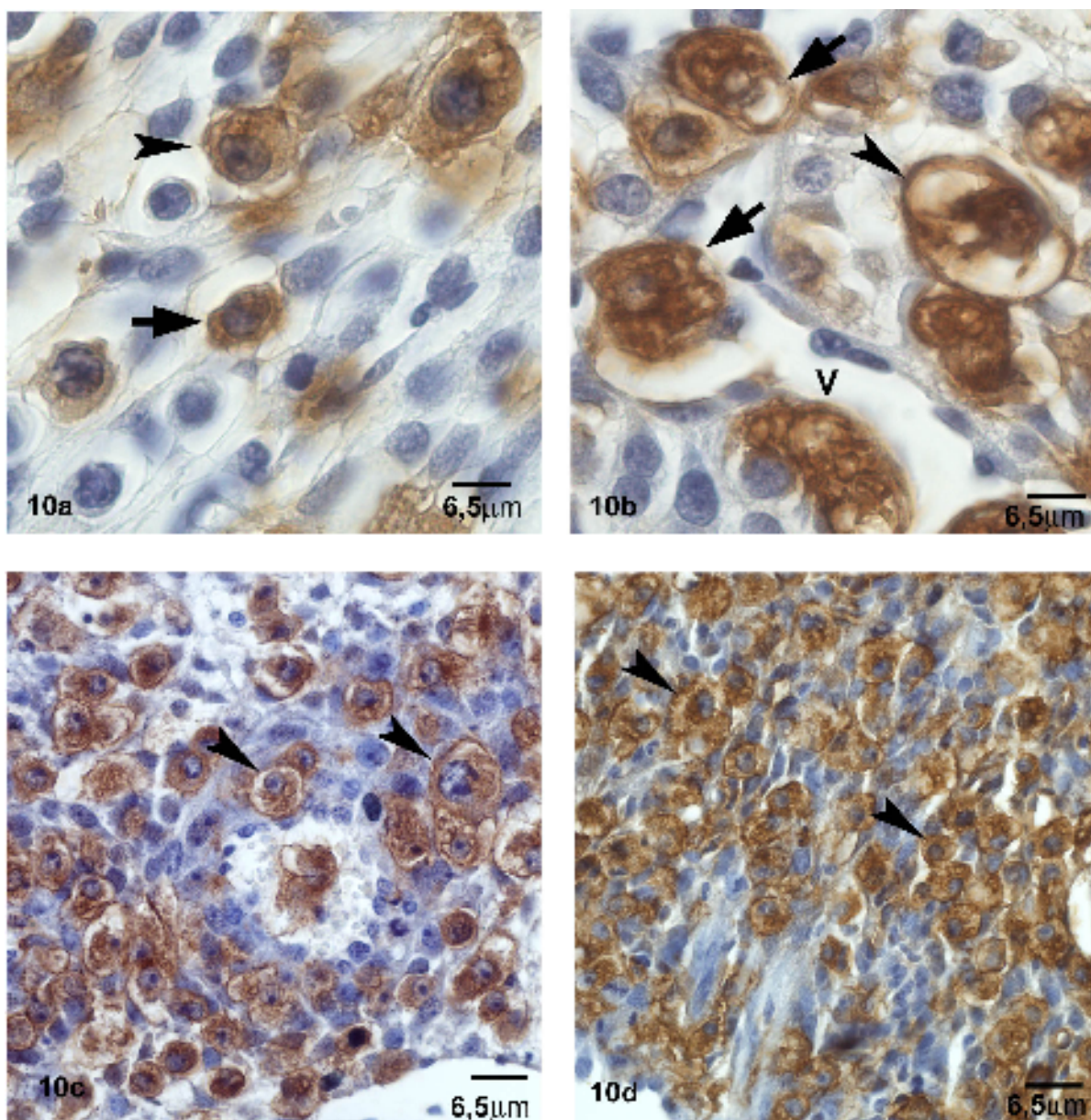


FIGURA 10: Fotomicrografias cortes histológicos de sítios de implantação no 10^o dg dos grupos. a, b) Sítios de implantação de animais do grupo 1. Em a, notar as células *uNK* dos subtipos 1 (seta) e subtipo 2 (cabeça de seta). Em b, notar as *uNK* dos subtipos 3 (seta) e subtipo 4 (cabeças de seta) c, d) Sítios de implantação de animais do grupo 2 e 3 respectivamente. Notar os grânulos e superfície das células *uNK* reativos para lectina DBA semelhante ao controle (cabeças de setas). V. vasos sanguíneos. Lectina DBA-peroxidase/hematoxilina.

Portanto, sendo as células *uNK* conhecidas por sua habilidade na manutenção da decídua e viabilidade embrionária, realizada por meio da síntese e secreção de *INF-γ* que causa a dilatação das artérias espiraladas da placenta, (ASHKAR e CROY, 1999 e 2001),

é razoável a hipótese de que estas pudessem ser estimuladas a aumentarem em número nos sítios de implantação de animais submetidos ao estresse físico como mecanismo compensatório à diminuição de aporte sanguíneo decorrente do exercício físico extenuante em animais não adaptados ao estresse (grupo G2). Interessantemente, o exercício físico antes do período gestacional (grupo G3) restabeleceu o número total de células *uNK* encontrado no controle (G1), o que demonstra, mais uma vez, a importância do exercício anterior a gestação como forma de adaptação ao estresse.

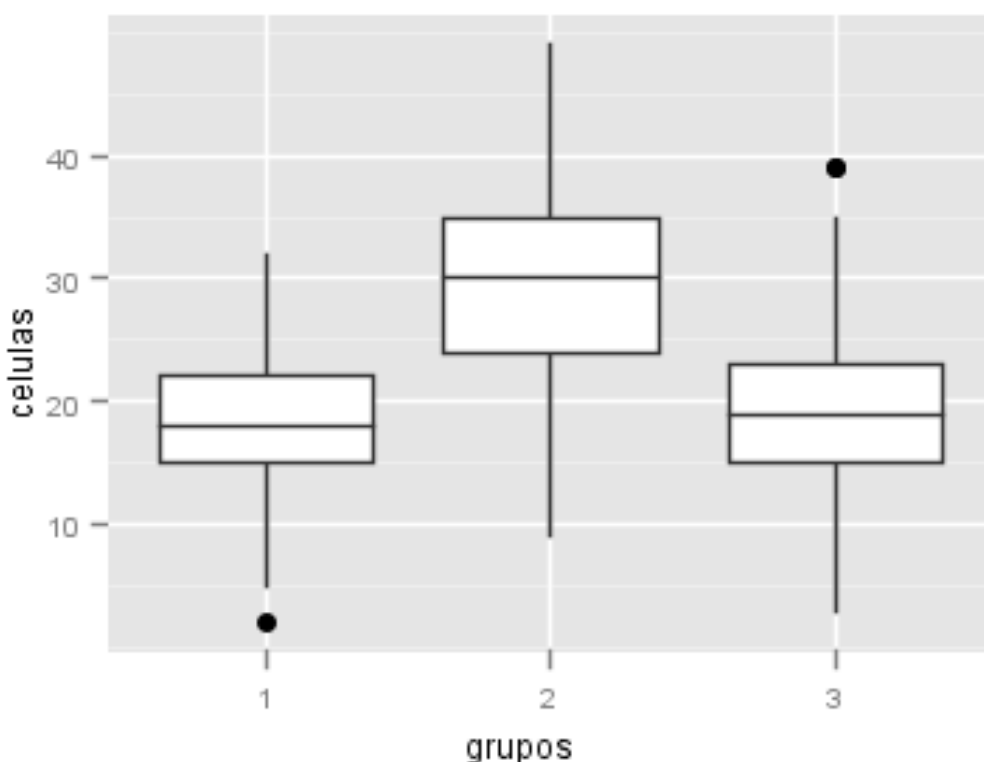


FIGURA 11: Representação de Box-Whiskers de células *uNK* em sítios de implantação de camundongos dos grupos 1, 2 e 3.

Durante a avaliação da influência do exercício extenuante sobre o número total de cada um dos subtipos de células *uNK* reativos à lectina *DBA* por grupo de animal (Figura 12) não foram notadas diferenças significativas no número de células *uNK* do subtipo I conhecidas como imaturas, (PAFFAO JR *et al*, 2003). No entanto, foi observado que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de *uNK* do subtipo II nos animais do grupo 2 (6/AT) e 3 (9/AT) em comparação com o grupo 1 (14/AT). Em contrapartida, as células *uNK* do subtipo III aumentaram significativamente ($p < 0,001$) em número nos

grupos 2 (20/AT) e 3 (14/AT) em comparação ao grupo 1 (9/AT). Os animais do grupo 3, no entanto, continuam em seus sítios de implantação um menor número de células *uNK* do subtipo III quando comparados ao grupo G2 ($p < 0,001$). Quanto às células *uNK* do subtipo IV, estas foram observadas em maior número nos animais do grupo 2 (9/AT) em relação ao grupo 1 (0/AT) e 3 (3/AT) ($p < 0,001$).

Estes resultados demonstram que o exercício físico causou aumento de células *uNK* plenamente diferenciadas e correspondentes ao subtipo III de acordo com Paffaro Jr *et al* (2003) nos grupos 2 e 3. As células *uNK* aumentam muito em número durante a gestação, chegando ao seu número máximo por volta do 10º dg (PAFFARO JR *et al*, 2003 e CORREIA-DA-SILVA *et al*, 2004), período concomitante ao pico de *INF-y* do útero de camundongos prenhes, (ASHKAR e CROY, 1999 e 2001).

Interessantemente, o aumento de células *uNK* do subtipo III é proporcional à diminuição das células *uNK* do subtipo II nestes animais em relação ao controle, logo podemos concluir que as células *uNK* do subtipo II foram levadas a se diferenciarem rapidamente em células do subtipo III em animais submetidos ao estresse físico. A não reposição de células do subtipo II nos animais do grupo 2 e 3 e concomitante não alteração do número de *uNK* do subtipo I nestes animais quando comparados ao controle sugerem fortemente que as células *uNK* de animais submetidos ao exercício físico proliferam e diferenciam localmente no ambiente uterino sem uma contribuição significativa do influxo de células precursoras periféricas.

Quando analisado o grupo 3, observamos que os animais pertencentes a este grupo, apresentam aumento em células *uNK* do subtipo III em relação ao controle, e estas células estavam em menor número quando comparado com o grupo 2. Além disso, nestes animais não foi notada alteração no número de células *uNK* do subtipo IV ao contrário do grupo 2 que possuía muitas destas células. As células *uNK* do subtipo IV foram descritas como aquelas em provável processo de morte celular, (PAFFARO JR, *et al* 2003). Tais resultados demonstram que o exercício anterior a prenhez realizado pelo grupo 3, previne a morte precoce das *uNK* ocorrida no grupo 2, e caracteriza mais uma evidência de adaptação ao estresse nos animais submetidos ao exercício físico anteriormente à prenhez.

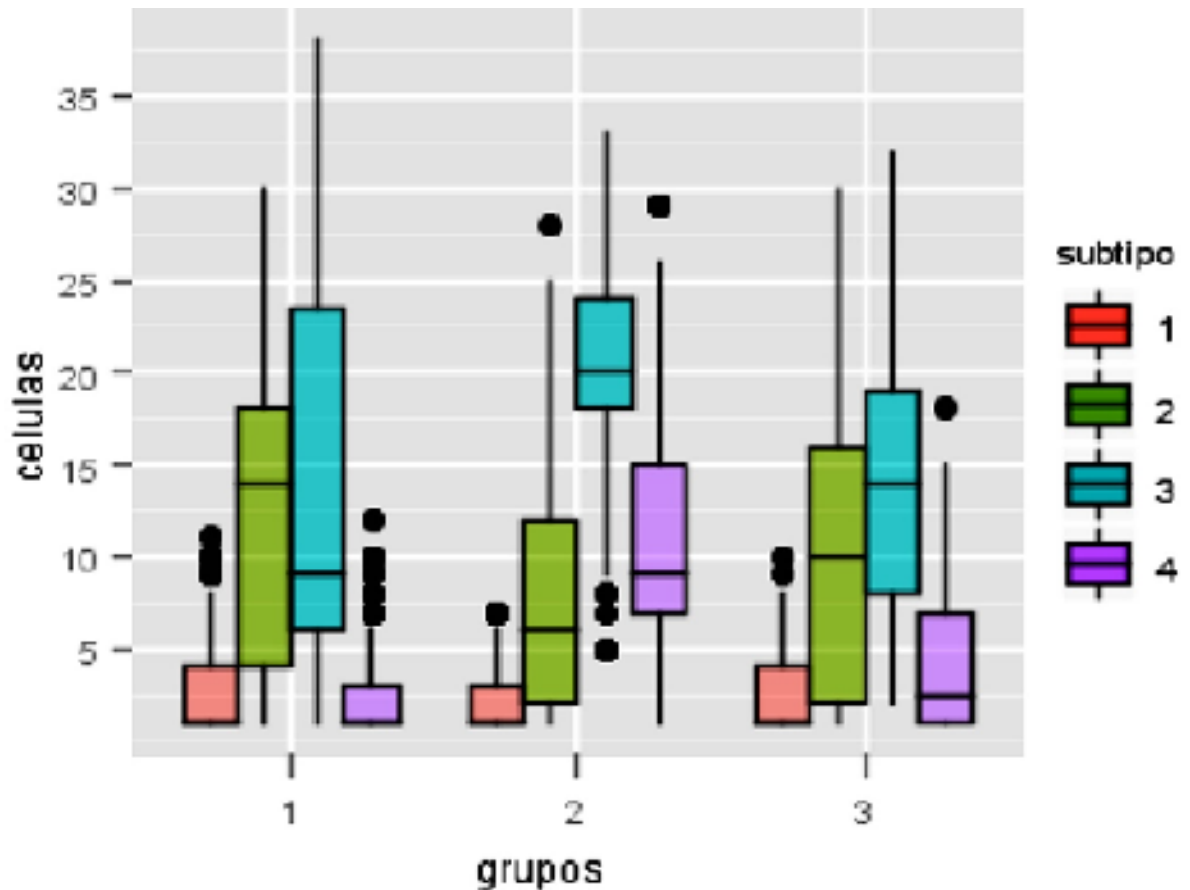


FIGURA 12: Número total dos quatro subtipos de células *uNK* nos diferentes grupos. A contagem total de células está representada por Box-Whikers.

Sabe-se que os fatores estressores primeiramente ativam o eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal (HHA) provocando a liberação de *ACTH* que ativa o córtex da adrenal a liberar os glicocorticóides, (MICHEL FERIN, 2006), principalmente o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores. Além disso, o estresse ativa o sistema nervoso simpático provocando uma elevada secreção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (DOUGLAS *et al*, 2010a). A resposta a estes sistemas induzem o organismo às alterações metabólicas e fisiológicas que são necessárias para buscar a homeostasia (CHROUSOS, 1998, MILLER e CALLAGHAN, 2002). Neste sentido, podemos sugerir que o incremento no número de células *uNK* nos sítios de implantação de animais do grupo 2 possa ter se constituído de uma resposta para restaurar o equilíbrio após estresse induzido por exercício físico extenuante.

Interessantemente, o aumento no número de *uNK* em resposta ao estresse não foi observado no grupo 3 em nossos estudos. Sabe-se que a corticosterona promove um

efeito de *feedback* negativo para reduzir a secreção de *CRH* e *ACTH*, participando no controle da homeostasia corporal na tentativa de bloquear a resposta ao estresse, (KELLER-WOOD e DALLMAN, 1984, KOVÁCS *et al*, 2000, ALAN G. WATTS, 2005). Assim, parece razoável supormos que os camundongos submetidos ao exercício extenuante anteriormente à prenhez, podem ter se adaptado aos hormônios do estresse, respondendo a ele de uma maneira menos intensa durante a gestação. Estes resultados vão de encontro aos observados por Sarah *et al* (2008) que sugeriram que o exercício poderia reduzir o impacto negativo do estresse por meio da habituação do eixo HHA, com menor liberação de glicocorticóides em roedores.

Sabe-se que os diferentes subtipos de células *uNK* reativos à lectina *DBA* se distribuem heterogeneamente no útero de camundongos durante a gestação normal. Assim sendo, os subtipos menos diferenciados são encontrados em áreas distantes do embrião e os mais diferenciados e senescentes próximos ao embrião implantado no 10º ddg, (PAFFARO JR *et al*, 2003). A existência deste gradiente de diferenciação nos levou a análise da distribuição dos quatro subtipos de células *uNK* em 3 diferentes microdomínios (3 áreas) do útero de camundongos prenhes neste estudo.

Assim sendo, na área 1, região mais distante do embrião e próxima ao miométrio da região mesometrial, foi encontrado um maior número de células *uNK* menos diferenciadas e correspondentes aos subtipos I (5/AT) e II (17/AT) em camundongos do grupo 1 (controle) em relação ao número de células do subtipo 3 (3/AT) contidas nestes animais (Figuras 13a e 13b). O subtipo IV (forma senescente) não foi observado em animais do grupo 1. Tais achados em camundongos normais são semelhantes aos encontrados por Paffaro Jr *et al* (2003). Na mesma área foi observado uma diminuição no número de células *uNK* do subtipo II (13/AT) ($p < 0,05$), concomitante a um aumento das do subtipo III (20/AT) em camundongos do grupo 2 ($p < 0,001$) (figura 13a e 13c). Além disso, as células do subtipo IV de *uNK* foram encontradas apenas nos animais do grupo 2. Nesta mesma área, apenas o subtipo III de células *uNK* estava aumentado quando comparados ao grupo 1 (figura 13a e 13d). Estes resultados revelam que as células *uNK* contidas na área 1, mesmo distantes do embrião, tiveram sua diferenciação mais acelerada em camundongos submetidos a exercício físico após o diagnóstico da gestação (grupo 2), propiciando até mesmo a constatação de células *uNK* com aspecto senescente (subtipo IV) nestes animais. Sendo que células *uNK* do subtipo IV não são usualmente identificadas em áreas distantes do embrião até o 10º dg, a ocorrência

destas células nos animais do grupo 2 sugere que o exercício físico suscitou modificações intensas no microambiente uterino que levaram a diferenciação das *uNK* mesmo em regiões distantes do embrião. No entanto, o exercício físico anterior a prenhez realizado pelos camundongos do grupo 3 parece prevenir a aceleração da diferenciação e senescência das *uNK* nesta área.

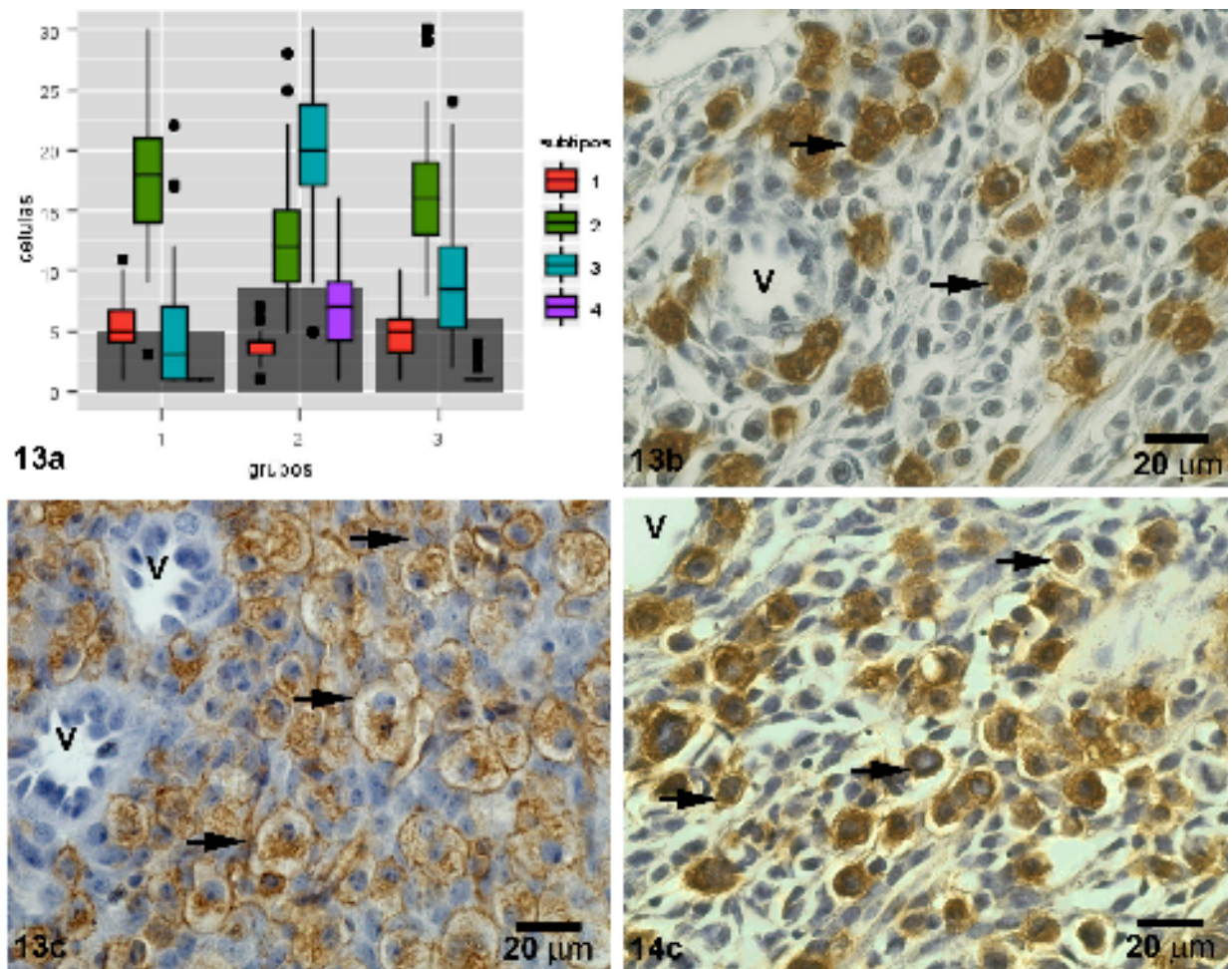


FIGURA 13: Estudo quantitativo da incidência dos 4 subtipos de *uNK* na área 1 dos sítios de implantação embrionária de camundongos no 10º dg. a) Número dos subtipos de células *uNK* dos grupos 1, 2 e 3. As barras representam os valores médios sobrepostos por Box Whiskers. b) Foto micrografia de animal do grupo 1, mostrando as células *uNK* do subtipo I e II predominando no endométrio desta área. c) Fotomicrografia de animal do grupo 2. Notar as células *uNK* do subtipo III e IV na área 1 destes animais (setas). d) Fotomicrografia de animal do grupo 3. Notar o aspecto histológico semelhante ao do controle, contendo grande número de células *uNK* imaturas (setas). V. vasos sanguíneos. Lectina DBA-peroxidase/hematoxilina.

Na área 2, região endometrial entre o miométrio e o embrião conhecida como área de intensa atividade proliferativa de *uNK*, segundo Paffaro Jr *et al* (2003) foi observado um maior número de células *uNK* do subtipo II (14/AT) e III (7/AT) em relação ao subtipo I (2/AT) nos camundongos do grupo 1 (Figuras 14a e 14b). Nestes animais, as *uNK* do subtipo IV foram ausentes nesta área, (Figura 14b). Tais achados também concordam com os dados obtidos por Paffaro Jr *et al* (2003) em camundongos normais. Em camundongos do grupo 2, foi observado um aumento em número ($p < 0,001$) de células *uNK* do subtipo III (20/AT) e IV (8/AT) (Figuras 14a e 14c), concomitante à diminuição no número ($p < 0,001$) de células do subtipo II (5/AT) quando comparado com animais do grupo 1.

Quanto aos animais do grupo 3, na área 2 (Figuras 14a e 14d), foi observado um número maior de células *uNK* ($p < 0,05$) do subtipo II (13/AT) quando comparado com o grupo 2 (5/AT), mas sem diferenças significativas em relação ao grupo 1 (14/AT). Nos mesmos animais e área, os subtipos III e IV eram mais numerosos (16 e 4/AT) ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo 1, porém eram menores em número quando comparados ao grupo 2 na mesma área. Quanto às células *uNK* do subtipo 1 da área 2, essas existiam em pequeno número e sem diferenças estatísticas em todos os animais estudados. No entanto, o número de células *uNK* do subtipo 1 era menor ($p < 0,05$) na área 2 que na área 1 em todos os grupos de animais.

Estes resultados demonstram que o exercício físico extenuante em animais do grupo 2 induziu aumento na quantidade de células *uNK* do subtipo III e IV com diminuição de *uNK* do subtipo II na área 2, de maneira semelhante ao observado na área 1 dos mesmos animais. No entanto, o aumento de células do subtipo 3 e o concomitante aparecimento das *uNK* do subtipo IV na área 2 dos animais do grupo 3 sugere que a área 2 seja uma região mais suscetível que a área 1 às alterações na diferenciação de *uNK* provocada por estresse físico, o que talvez seja justificado pela sua maior proximidade ao embrião implantado e ao endométrio decidualizado. No entanto, novamente, as células *uNK* de animais do grupo 3 parecem ter sofrido uma menor influência do exercício físico o que pode ser inferido por meio da constatação de uma menor quantidade de subtipos diferenciados e senescentes na área 2 em comparação com animais do grupo 2.

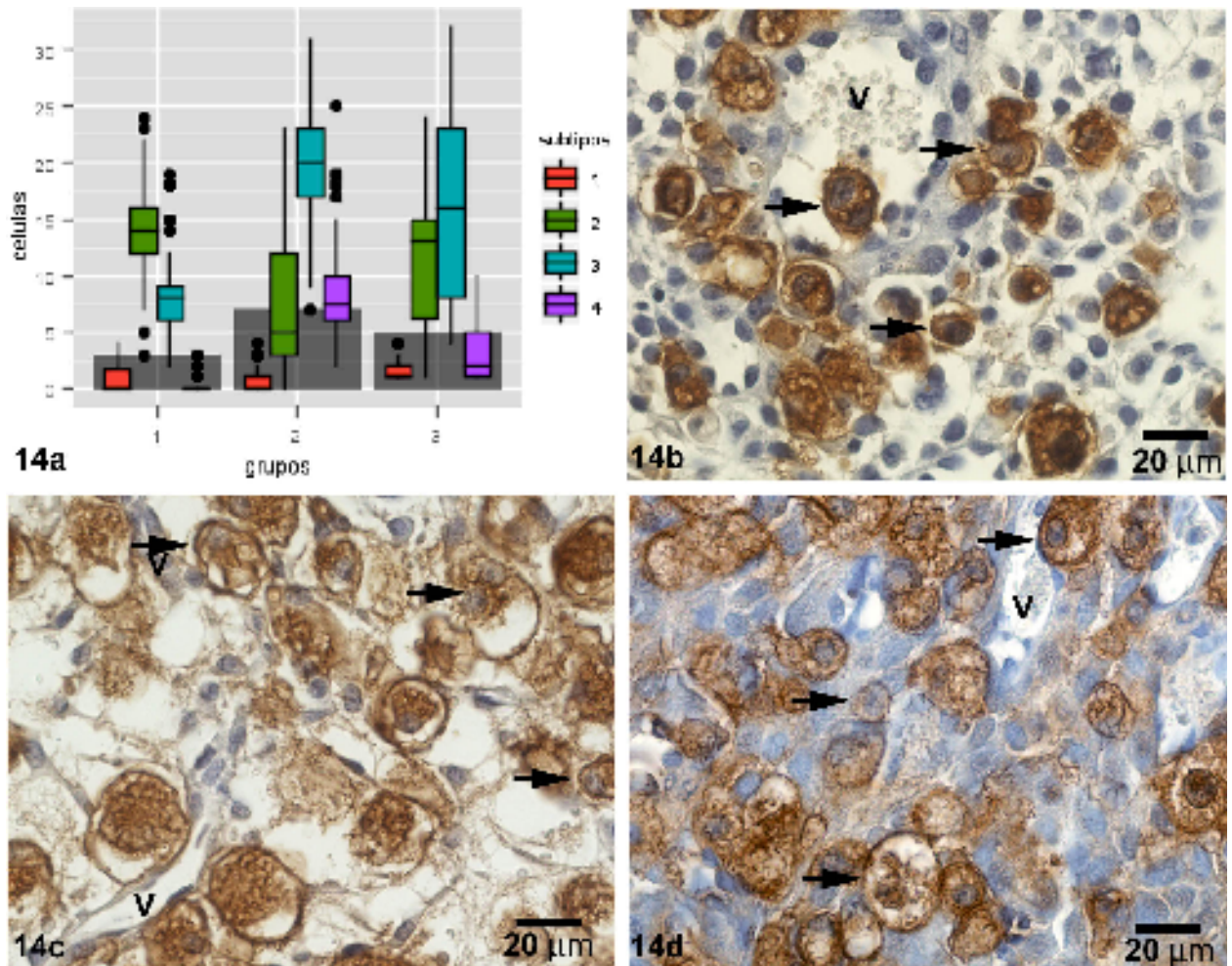


FIGURA 14: Estudo quantitativo da incidência dos 4 subtipos de *uNK* na área 2 dos sítios de implantação embrionária de camundongos no 10º dg. a) Número dos subtipos de células *uNK* nos grupos 1, 2 e 3. As barras representam os valores médios sobreposto por Box Whiskers b) Fotomicrografia de animal do grupo 1, mostrando as células *uNK* do subtipo II e III predominando no endométrio desta área. c) Fotomicrografia de animal do grupo 2. Notar as grandes células *uNK* do subtipo III e IV na área 2 destes animais (setas). d) Fotomicrografia de animal do grupo 3. Notar células *uNK* do subtipo II, III e IV (setas) na área 2 deste animal. V. vasos sanguíneos. Lectina DBA-peroxidase/hematoxilina.

Na área 3 de animais do grupo 1, concordando com os dados obtidos por Paffaro Jr *et al* (2003), não foram observadas células *uNK* do subtipo I, as do subtipo II eram raras, do subtipo III abundantes (28/AT) e as do subtipo IV foram encontradas pela primeira vez neste grupo (5/AT) (Figura 15a e 15b). No grupo 2 e 3, no entanto, foi observado um aumento significativo ($p < 0,01$) no número de *uNK* do subtipo IV (16 e 9/AT), respectivamente, concomitante a diminuição na quantidade de *uNK* do subtipo 3 na mesma área nestes animais (Figura 15a, 15c, 15d). Além disso, a quantidade de células *uNK* dos subtipos III e IV nos animais do grupo 3 era menor que a encontrada nos

animais do grupo 2 nesta área ($p < 0,05$) e não houveram diferenças significativas na ocorrência de células *uNK* do subtipo 1 entre os 3 grupos estudados. Os resultados observados na área 3 sugerem a diferenciação de células *uNK* do subtipo III para aquelas correspondentes ao subtipo IV nesta área nos animais dos grupos 2 e 3. Ou seja, nas 3 áreas analisadas neste estudo foi observado um efeito menor do exercício físico no incremento da diferenciação das células *uNK* de animais do grupo 3, o que reforça muito a hipótese de adaptação ao estresse em animais submetidos ao programa de treinamento físico previamente à gestação.

O fato do número de células *uNK* do subtipo 1, apontado como forma precursora das *uNK*, manter-se inalterado em todas as áreas analisadas e em todos os grupos, se constitui de um forte indício de que não existe um grande influxo adicional de células *uNK* precursoras para o útero provocado pelo estresse. Este resultado, aliado ao fato de que em animais do grupo 3, em áreas distantes do embrião e da decídua (área 1), o número dos subtipos I, II e IV de *uNK* não foi diferente do controle, sugere que o aumento de células *uNK* após estresse físico seja provocado por alterações em fatores de ação parácrina e que podem ser secretados pelo trofoblasto e/ou decídua. Estes fatores seriam, portanto, incapazes de suscitar um grande influxo adicional de *uNK* para o útero e teriam maior dificuldade em atingir células alvo distantes das células sinalizadoras em função da ação local e limitada que é característica da secreção parácrina.

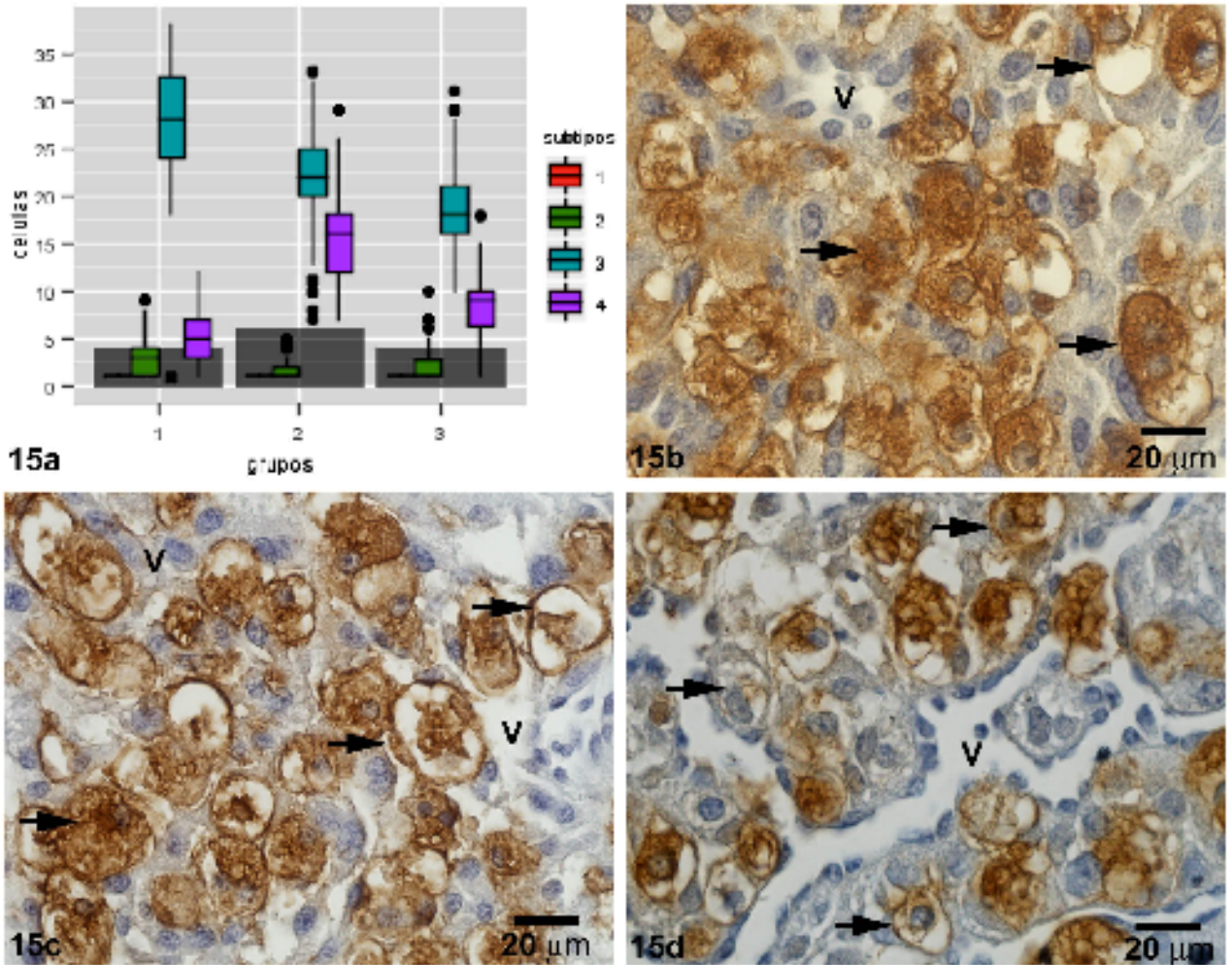


FIGURA 15: Estudo quantitativo da incidência dos 4 subtipos de *uNK* na área 3 dos sítios de implantação embrionária de camundongos no 10º dg. a) Número dos subtipos de células *uNK* nos grupos 1, 2 e 3. As barras representam os valores médios sobreposto por Box Whiskers. b) Fotomicrografia de animal do grupo 1, mostrando as células *uNK* do subtipo III e IV predominando no endométrio desta área. c) Fotomicrografia de animal do grupo 2. Notar várias células *uNK* do subtipo III e IV predominando na área 3 destes animais (setas). d) Fotomicrografia de animal do grupo 3. Notar predomínio de células *uNK* do subtipo III, e IV (setas) na área 3 deste animal. V. vasos sanguíneos. Lectina DBA-peroxidase/hematoxilina.

Neste estudo, apesar de serem inicialmente esperadas, não foram observadas alterações no padrão de reatividade das células *uNK* para a lectina *DBA*. Tais alterações foram descritas por Roman (2001), que utilizou um modelo de lesão embrionária e constatou alterações marcantes nesta reatividade sugerindo a possível perda do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos destas células. Adicionalmente, Shaun *et al* (2005), descreveram um aumento vigoroso da atividade citotóxica e invasiva das células *uNK* em camundongos $IL-10^{-/-}$ exposto ao estresse imunológico propiciado pelo LPS,

levando a morte fetal de maneira dose-dependente ou restrição do crescimento embrionário intra-uterino.

A não evidência morfológica de citotoxicidade das células *uNK* uterinas em nossos estudos, sugere que o efeito estressor promovido pelo exercício físico extenuante não desencadeou este fenômeno nas células *uNK*.

Por outro lado, muitos autores mostraram que os glicocorticóides exercem efeitos nas células endometriais, (HOFFMAN *et al*, 1984 e SALAMONSEN, 1996), mas seu papel no endométrio não é bem compreendido. Bamberger *et al* (2001), reportaram expressão de receptores de glicocorticóides no útero durante o ciclo menstrual e na decídua, sendo exclusivamente expresso no estroma, incluindo células endoteliais e linfóides, mas não investigaram se este era expresso por *uNK*. HENDERSON *et al* (2003), encontraram altos níveis de *mRNA* em amostras purificadas de *uNK*. As funções imunes específicas dos glicocorticóides no endométrio sugerem efeitos na implantação, (HOFFMAN *et al*, 1984), na proliferação celular (BIGSBY, 1993), apoptose (JO *et al*, 1993) e remodelamento endometrial, (SALAMONSEN, 1996). Assim como as células *uNK*, os glicocorticóides parecem apresentar importante papel na decidualização, (HENDERSON *et al*, 2003).

Analisando nossos resultados em camundongos, em conjunto com estudos encontrados na literatura da neuroendocrinologia do estresse durante a gestação, podemos propor uma hipótese para o mecanismo de ação do exercício físico como agente estressor e causador de diminuição nas taxas de implantação, viabilidade embrionária e aumento da perda fetal observadas em nosso modelo.

Sabe-se que as células trofoblásticas de roedores secretam hormônios como lactogênio placentário que são ligantes de receptores de prolactina e mantêm a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, desempenhando assim, função semelhante a da gonadotrofina coriônica (HCG) de humanos, (GRATTAN *et al*, 2008). A decídua de roedores e humanos expressa também ambos, prolactina e receptores de prolactina que são muito importantes para a decidualização, (JABBOUR e CRITCHLEY, 2001; LYNCH *et al*, 2009; KIMURA *et al*, 2001, BEM-JONATHAN *et al*, 2008, BAO *et al*, 2007). 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). Estas, são essenciais para manutenção da tolerância imunológica,

característica do microambiente uterino durante a gestação, (DOUGLAS, 2010; DRUCKMANN E DRUCKMANN, 2005).

Portanto, é razoável supormos que o exercício físico extenuante em animais que se mantiveram sedentários até o momento do diagnóstico da prenhez provocou, como outros fatores estressores, estímulo no eixo Hipotálamo-Hipófise-adrenal (HHA) levando a liberação de *ACTH* que ativou o córtex da adrenal a liberar corticosterona nestes animais, estimulando, paralelamente o sistema nervoso simpático com consequente aumento na secreção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), (DOUGLAS, 2010a, DOUGLAS 2010b, MICHEL FERIN, 2006; ARCK *et al*, 2007; PARKER e DOUGLAS, 2010). Tais fenômenos poderiam ter levado a diminuição da secreção de prolactina pelas células decíduais e/ou trofoblásticas, levando a redução dos níveis de progesterona, e estimulando o aumentando da secreção parácrina de citocinas pró-inflamatórias (*IL-12*, *IL-1*, *IL-6*, *TNK- α* e *INF- γ*) (DOUGLAS, 2010a, DOUGLAS 2010b, BLOIS *et al*, 2004), causando uma perturbação no balanço das respostas Th1 e Th2 (DOUGLAS, 2010a), prejudicando assim a implantação e promovendo a morte embrionária.

Embora tenha sido demonstrado que a progesterona confere certa resistência ao estresse durante a gestação, ligando-se a seu receptor nos linfócitos decíduais, induzindo a liberação de *PIBF* e inibindo a exocitose destas células, (LASKARIN *et al*, 2002, JOACHIM *et al*, 2003, ARCK *et al*, 2007), o estresse físico parece não provocar a resposta citotóxica de células *uNK* em nossos estudos. Neste sentido, a aceleração da diferenciação de células *uNK*, notada nestes animais, poderia se constituir de uma resposta a secreção de citocinas inflamatórias, levando estas células a secretarem intensamente *INF- γ* que é conhecido por sua função na dilatação das artérias espiradas da placenta promovendo a manutenção da decídua e nutrição do embrião, (ASHKAR e CROY, 1999; ASHKAR e CROY, 2001), como uma tentativa de recuperação da homeostase uterina. Assim, este fato poderia justificar a constatação de alguns sítios de implantação de aparência normal contendo placenta muito diferenciada nestes animais (figuras 9 e 16).

No entanto, foi notada nos animais do grupo 3, desde a restauração das taxas normais de implantação, aumento da viabilidade embrionária, menor perda fetal, restauração do número normal de células *uNK* e um menor efeito na aceleração da diferenciação destas células.

Ou seja, em todas as nossas análises procedidas em animais que foram submetidos ao exercício físico antes e depois do diagnóstico da prenhez (grupo 3), foram obtidos dados que sugerem ter havido uma adaptação do eixo HHA, o que caracteriza a denominada fase de resistência ao estresse, que ocorre quando o estímulo estressor não é interrompido, (KELLER-WOOD e DALLMAN, 1984; LUNDBERG, 2000; McEWEN, 2000).

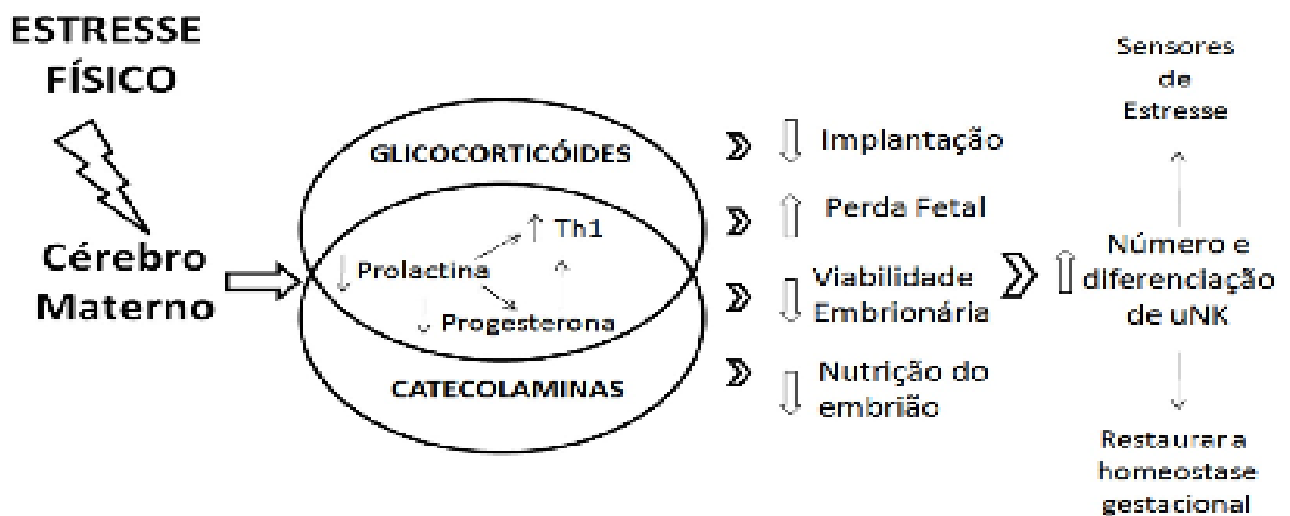


FIGURA 16: Hipótese para o mecanismo de perda gestacional em função de estresse do exercício físico extenuante em camundongos até a metade da gestação. A exposição ao estresse pode induzir mudanças no cérebro e corpo que podem prejudicar o equilíbrio na interface materno-fetal. Os glicocorticóides e catecolaminas são conhecidos por serem secretados em resposta ao estresse. Estes hormônios podem romper o equilíbrio da resposta Th1/Th2 fundamental para o sucesso da gestação. O aumento no número e na diferenciação das *uNK* poderia ser considerado como um indicador de estresse e se constituir de uma resposta para restabelecimento da homeostase gestacional. Modificado de Douglas, 2010.

Neste sentido podemos supor que níveis altos e ininterruptos de corticosterona possivelmente produzidos pelos animais do grupo 3 promoveram feedback negativo reduzindo a secreção de *CRH* e *ACTH*, adaptando estes animais ao estresse. E, esta adaptação pode ter levado a um incremento na secreção de prolactina pelas células decíduais e ou trofoblásticas, para restabelecimento dos níveis de progesterona, com um impacto menor sobre a secreção parácrina de citocinas pró-inflamatórias para menor perturbação no balanço das respostas Th1 e Th2, restabelecendo as taxas de implantação e o número total de células *uNK* nestes animais.

Contudo, o efeito protetor do exercício extenuante anteriormente a prenhez parece não ser suficiente para restabelecer completamente a homeostase gestacional, sendo que, nos animais do grupo 3, foi também observada perda embrionária, diminuição da viabilidade fetal, aceleração na diferenciação de células *uNK*, mesmo que em níveis menores que os encontrados em animais do grupo 2.

Enfim, este estudo demonstrou a capacidade das células *uNK* em aumentarem em número e se diferenciarem rapidamente no útero quando os camundongos são submetidos ao estresse do exercício físico extenuante. Nossos resultados indicam que o aumento em número de células *uNK*, principalmente das formas mais diferenciadas destas células, possa ser considerado como um sensor da ocorrência de estresse nestes animais. A aceleração na diferenciação das *uNK* no útero pode ter levado estas células a secretarem fatores não citotóxicos, direcionados ao restabelecimento da homeostasia gestacional.

Esse modelo de estresse físico durante a gestação de camundongos, estabelecido durante nossos trabalhos de mestrado, propiciou resultados que indicam que o mesmo poderá ser utilizado em estudos futuros, para contribuir com o conhecimento das alterações neuroimunoendócrinas induzidas pelo estresse durante a gestação de camundongos e seres humanos.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados após análise morfológica, citoquímica e estereológica do útero prenhe de camundongos submetidos a duas condições de exercício físico extenuante estabelecidas neste estudo nos permitiram concluir que:

O exercício extenuante realizado pelos animais apenas após o diagnóstico da prenhez causou a diminuição do peso materno, diminuição no número de implantações embrionárias; hemorragia e morte embrionária, e aumento do número total de células *uNK*, representado principalmente pelo aumento de subtipos celulares mais diferenciados e senescentes.

O exercício extenuante realizado anteriormente e após o diagnóstico da prenhez causou aumento do peso materno, hemorragia, morte embrionária, aumento nos subtipos diferenciados e senescentes. No entanto, os efeitos do estresse nestes animais foram menores, quando comparados com animais que não foram submetidos a um período de adaptação.

Os resultados inéditos deste estudo prospectivo revelaram que o modelo de exercício físico extenuante em camundongos prenhes aqui estabelecido se constitui em uma ferramenta eficiente para a avaliação do comportamento das células *uNK* frente à condição de estresse. Este modelo poderá ser utilizado em estudos futuros para avaliação de moléculas relacionadas ao estresse, a angiogênese, manutenção da decídua e do embrião a fim de auxiliar no esclarecimento de fenômenos envolvidos no equilíbrio existente na interface materno-fetal durante a gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomy of Embryology**, v.166, p. 263-274, 1983.

AIBA Y., OGAWA M. Development of natural killer cells, B lymphocytes, macrophages, and mast cells from single hematopoietic progenitors in culture of murine fetal liver cells. **Blood**, v. 90, p. 3923. 1997.

ALAN G. WATTS. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: A complexity beyond negative feedback. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.26, p.109–130, 2005.

APLIN J.D., GLASSER S.R. The interaction of trophoblast with endometrial stroma. In: Endocrinology of embryo-endometrium interactions. GLASSER S.R., MULHOLLAND. **Journal of Psychosomatics**, New York, Plenum Press, p. 327-341, 1994.

ARCK P., HANSEN P.J., JERICEVIC B.M., PICCINI M.P., SZEKERES-BARTHO J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. **Am J Reprod Immunol**, v.58, p. 268–79, 2007.

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

ASHKAR A.A., CROY B.A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Semin Immunol**, v.13, p.235–241, 2001.

BAJENOFF M, BREART B, HUANG A.Y, QI H, CAZARETH J, BRAUD V.M., GERMAIN R.N., GLAICHENHAUS N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **J Exp Med**, v.203, p.619–631, 2006.

BAMBERGER AM, MILDE-LANGOSCH K, LONING T, BAMBERGER CM. The glucocorticoid receptor is specifically expressed in the stromal compartment of the human endometrium. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 5071–5074, 2001.

BANY B.M., CROSS J.C. Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. **Dev Biol**, v. 294, p. 445–456, 2006.

BAO L, TESSIER C, PRIGENT-TESSIER A, LI FX, BUZZIO OL, CALLEGARI EA. Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy. **Endocrinology**, v.148, p. 2326–34, 2007.

BENTE KLARLUND PEDERSEN e ADAM STEENSBERG. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6—shared mechanisms? **Med. Sci. Sports Exercise**, v.34, p.2004–2012, 2002.

BENTE KLARLUND PEDERSEN e LAURIE HOFFMAN-GOETZ. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 3, 2000.

BEN-JONATHAN N, LAPENSEE CR, LAPENSEE EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? **Endocrine Rev**, v. 29, p.1-41, 2008.

BERNARD, O.; SCHIED, M. P.; RIPOCHE, M-A.; BENNET, D... Immunological Studies of Mouse Decidual cells.1. Membrane Markers of Decidual Cells in the Days after implantation. **Journal of experimental Medicine**, v.148, p. 580-591, 1978.

BEVILACQUA E.M.A.F., FARIA M.R. e ABRAHAMSOHN P.A. Growth of mouse ectoplacental cone cells in subcutaneous tissue. Development of placental-like cells. **American Journal of Anatomy**, v.192, p.382-399, 1991.

BIGSBY R.M. Progesterone and dexamethasone inhibition of estrogen induced synthesis of DNA and complement in rat uterine epithelium: effects of antiprogesterone compounds. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 45, p.295–301,1993.

BILINSKI MJ, THORNE JG, OH MJ, LEONARD S, MURRANT C, TAYADE C, CROY BA. Uterine NK cells in murine pregnancy. **Reprod Biomed**, v.16, p. 218-26, 2008.

BLASIUS A.L., BARCHET W, CELLA M, COLONNA M. Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. **J Exp Med**, v. 204, p. 2561–2568, 2007.

BLASIVUS A.I., WINFRIED BARCHET, MARINA CELLA, AND MARCO COLONNA. Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 2561-2568, 2007

BULMER, D. STEWART, L., PEEL, S. Endometrial granulocytes of the pregnant hamster. **Journal Anatomy**, v.136, p. 329-337, 1983.

BURKARDT, J.K., HESTER, S., LAPHAM, C.K. and ARGON, Y. The lytic Granules of NK cells are dual function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. **J. Cell Biol**, v.111, p. 2327-2340, 1990.

BURTON G.J., JAUNIAUX E, CHARNOCK-JONES D.S. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta**, v.28, p. S64–69, 2007.

BLASIVUS A.L.,BARCHET W., CELLA M., COLONNA M. Development and function of murine B220 _ CD11c _ NK1.1 _ cells identify them as a subset of NK cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 2561-2568, 2007.

BLOIS S.M., *et al.* Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile. **J Immunol**, v.172, p. 5893–9, 2004.

BONEN A, CAMPAGNA P, GILCRIST L, YOUNG DC, BERESFORD P. Substrate and endocrine responses during exercise at selected stages of pregnancy. **J Appl Physiol**, v. 73, p.134–42, 1992.

CADOPPO J.T *et al.* Autonomic, neuroendocrine, and immune responses to psychological stress: the reactivity hypothesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, p. 664–73, 1998.

CASTREN E e SAAVEDRA J.M. Repeated stress increases the density of angiotensina II binding in sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. **Endocrinology**, v.122, p.370-372,1988.

CROY B.A. Granulated metrial gland cells: hypotheses concerning possible function during murine gestation. **Journal Immunology**, v. 27, p. 85-94, 1994.

CROY A.B., VAN DEN HEUVEL M.J., BORZYCHOWSKI A.M., TAYADE C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunol Rev**, v. 214, p. 161–185, 2006.

CAMPBELL J.J *et al.* Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. **J Immunol**, v.166, p. 6477–6482, 2001.

CHAN A., *et al.* CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. **J Immunol**, v.179, p.89–94, 2007.

CHANTAKRU S, KUZIEL WA, MAEDA N, CROY BA. 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**, v.49, p.33–47, 2001.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann. N Y Acad. Sci**, v.851, p. 311–335. 1998.

CARLINO, CLAUDIA *et al.* Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. **Blood**, v.111, p. 3108-3114, 2008.

CLARK A.M., *et al.* Weight loss results in significant improvement in pregnancy and ovulation rates in anovulatory obese women. **Hum Reprod**, v.10, p.2705–2712, 1995.

COLUCCI, F., CALIGIURI M.A., Di SANTO J.P. What does it take to make a natural killer? **Nat. Rev**, v.3, p.413-425, 2003.

COLUCCI, F., DI SANTO J.P, AND P. J. LEIBSON.. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? **Nat. Immunol**, v.3, p.807–813. 2002.

COOPER MA, FEHNIGER TA, CALIGIURI MA. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, p.633–640, 2001.

CORRÊA DA SILVA, C.R. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus Musculus*) prenhes. Campinas UNICAMP. Dissertação (Mestrado Biologia) **UNICAMP, Instituto de Biologia**, 1997. p. 71.

CORREA-DA-SILVA,G., *et al.* Patterns of Uterine Cellular Proliferation and Apoptosis in the Implantation Site of the Rat During Pregnancy. **Placenta**, v.25, p. 538-547, 2004.

CROY BA. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? **J Reprod Immunol**, v.42, p.127-9, 1999.

CROY B.A, *et al.* Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **J Reprod Immunol**, v.19, p.149–166, 1991.

CROY, B. A, *et al.* Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling. **Reproduction**,v.126, p.149–160, 2003.

CROY BA, KISO Y. Granulated metrial gland cells, a natural subset of the pregnant murine uterus. **Microsc Res Tech**, v.25, p.189–200, 1993.

CROY, B.A., LUROSS,J.A,GUILMOND, M.J., HUNT,J. Uterine Natural Killer cells: insights into lineage relationships and functions from studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. **Natural Immunity**, v.15, p. 22-33, 1996-1997.

CROY, B.A. *et al.* Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.37, p.8755-8920,1997a.

CROY B. A, *et al.* Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunol Rev**, v. 214, p.161-185, 2006.

CROY BA, *et al.* Analysis of uterine natural killer cells in mice. In: Campbell KS Natural Killer Cell Protocols, 2nd edn. Totowa, NJ: **Humana Press**, p. 465–503, 2010.

DICKSON, A.D.; BULMER, D. The fine structure of cells in the rat metrial gland. **J. Anat**, v.108, p.123-133,1971.

DOLORES P. PARDINI. Alterações Hormonais da Mulher Atleta. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.45, p.343-351, 2001.

DOUGLAS AJ. Baby on board: do responses to stress in the maternal brain mediate adverse pregnancy outcome? **Front Neuroendocrinol**, v.31, p. 359-76, 2010.

DOUGLAS AJ. Mother-offspring dialogue in early pregnancy: Impact of adverse

environment on pregnancy maintenance and neurobiology. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*, v.3, 2010.

DRUCKMANN, M.A. DRUCKMANN, Progesterone and the immunology of pregnancy, *J. Ster. Biochem. Mol. Biol*, v. 97, p. 389–396, 2005.

EL COSTA H, *et al.* Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol*, v.181, p.3009–3017, 2008.

ERIKSSON M, MEADOWS SK, WIRA CR, SENTMAN CL. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. *J Leukoc Biol*, v.76, p.667–675, 2004.

FAUST Z, LASKARIN G, RUKAVINA D, SZEKERES-BARTHO J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. *Am J Reprod Immunol*, v.42, p.71–75, 1999.

FERLAZZO G., *et al.* Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, p.16606–16611, 2004.

FEHNIGER TA, *et al.* CD56bright Natural Killer Cells are Present in Human Lymph Nodes and are Activated by T cell Derived IL-2: a Potential New Link between Adaptive and Innate Immunity. *Blood*, v.12, p.12, 2003.

FREUD, AG, CALIGIURI M.A. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev*, v.214, p.56-72, 2006.

FRISCH, R.E., MCARTHUR J.W. Menstrual cycles: fatness as a determinant as a minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science*, v.185, p. 949–51, 1974.

GARROD, K.R., *et al.* Natural killer cells actively patrol peripheral lymph nodes forming stable conjugates to eliminate MHC-mismatched targets. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*, v.104, p.12081–12086, 2007.

GRATTAN DR, *et al.* Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. *J Neuroendocrinology*, v.20, p.497–507, 2008.

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

HANNA J, MANDELBOIM O. When killers become helpers. **Trends Immunol**, v.28, p.201–206, 2007.

HATTA ,K. 2009. Evaluation of Homing and Functions of Uterine Natural Killer Cells. A thesis submitted to the Department of Microbiology and Immunology In conformity with the requirements for the degree of Master of Science. **Queen's University Kingston, Ontario, Canada**, December, 2009.

HAYAKAWA Y, SMYTH M. J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. **J Immunol**, v.176, p.1517–1524, 2006.

HENDERSON, T.A., *et al.* Steroid Receptor Expression in Uterine Natural Killer Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, p.440–449, 2003.

HERINGTON J.L., UNDERWOOD T, MCCONAHA M, BANY BM. Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. **Endocrinology**, v.150, p.4404–4413, 2009.

HETHERINGTON, C. M., AND D. P. HUMBER.. The effects of pregnancy on lymph node weight in the mouse. **J. Immunogenet**, v.4, p.271,1977.

HIBY SE, *et al.* Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, v.23, p.972–6. 2008.

HIBY, S. E., *et al.* Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. **J. Exp. Med**, v.200, p.957–965. 2004.

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**, v.49, p.130–136,1996.

HOFFMAN L.H, DAVENPORT G.R, BRASH A.R. Endometrial prostaglandins and phospholipase activity related to implantation in rabbits: effects of dexamethasone. **Biol Reprod**, v.30, p.544–555,1984.

HOFFMAN-GOETZ L AND PEDERSEN BK. Exercise and the immune system: a model of the stress response? **Immunol Today**, v.15, p.382–387, 1994.

HUNTINGTON N. D, *et al.* NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. **J Immunol**, v.178, p.4764–4770, 2007.

JABBOUR HN, CRITCHLEY HOD. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. **Reproduction**, v.121, p.197–205, 2001.

JALECO, A. C., *et al.* Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not a site for development of CD34₊ cells into T cells. **J. Immunol**, v.152, p.694, 1997.

JIANHONG ZHANG, *et al.* Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cellular & Molecular Immunology**, p.1–11, 2010.

JOACHIM R, *et al.* The progesterone derivative dydrogesterone abrogates murine stress-triggered abortion by inducing a Th2 biased local immune response. **Steroids**. V.68, p.931–40, 2003.

JO T, TERADA N, SAJI F, TANIZAWA O. Inhibitory effects of estrogen, progesterone, androgen and glucocorticoid on death of neonatal mouse uterine epithelial cells induced to proliferate by estrogen. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.46, p.25–32, 1993.

JUREWICZ M, *et al.* Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. **J.Am.Soc.Nephrol**, v.18, p.1093-1102, 2007.

KATRINA NAKAMURA, SAM SHEPS, PETRA CLARA ARCK. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.25, p.47–62, 2008.

KELLER-WOOD, M. E., AND DALLMAN, M. F. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr. Rev**, v.5, p.1–24, 1984.

KENNELLY M.M., *et al.* Exercise-related changes in umbilical and uterine artery waveforms as assessed by Doppler ultrasound scans. **Am J Obstet Gynecol**, v.187, p.661– 6, 2002.

KESKIN DB, *et al.* TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16) NK cells with similarities to decidual NK cells. **Proc Natl Academic Sci**, v. 104, p.3378–3383, 2007.

KIESSLING R, KLEIN E, WIGZELL H. “Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol**, v.5, p.112–117,1975.

KIMURA F, *et al.* Messenger ribonucleic acid for the mouse decidual prolactin is present and induced during in vitro decidualization of endometrial stromal cells. **Gynecol Endocrinol**, v.15, p.426–32, 2001.

KING A, *et al.* HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94 /NKG2 receptors on decidual NK cells. **Eur J Immunol**, v.30, p.1623–1631, 2000.

KING A. Uterine leukocytes and decidualization. **Hum Reprod Update**, v. 6, p.28–36, 2000.

.KISO Y, YAMASHIRO S, MCBEY BA, CROY BA. Tissue-specific differentiation of a natural killer cell subset in ectopically grafted murine uterine tissue. **Transplantation**, v.54, p.185–187,1992.

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

KOOPMAN LA, *et al.* Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med**, v.198, p.1201–1212, 2003.

KOVÁCS K.J, FOLDES A., SAWCHENKO P.E. Glucocorticoid negative feedback selectively targets vasopressin transcription in parvocellular neurosecretory neurons, **J. Neurosci**, v.20, p.3843–3852, 2000.

KRAMER M.S., MACDONALD S.W. Aerobic exercise for women during pregnancy. **Cochrane Database of Syst Rev**, v.3, p.180, 2006.

LACHAPELLE MH, MIRON P, HEMMINGS R, ROY DC. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. **J Immunol**, v.156, p.4027–4034, 1996.

LAIRD, S.M. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. **Hum. Reprod. Update**, v.9, p.163–174, 2003.

LANIER LL, *et al.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.136, p.4480–4486, 1986.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu. Rev. Immunol**, v. 23, p.225–274, 2005.

LARKIN, L. H. & FLICKINGER, C. J. Ultrastructure of the metrial gland cell in the pregnant rat. **American Journal of Anatomy**, v.126, p.337-354, 1969.

LASKARIN G, *et al.* Progesterone induced blocking factor (PIBF) mediates progesterone induced suppression of decidual lymphocyte cytotoxicity. **Am J Reprod Immunol**, v.48, p.201–209, 2002.

LARKIN, L.H.; FLICKINGER, C.J. Ultrastructure of the metrial gland cell in the pregnant rat. **Am. J. Anat**, v.126, p.337-354, 1969.

LASH GE, ROBSON SC, BULMER JN. Review: functional role of uterine natural killer (*uNK*) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta**, v.31, p.S87–S92, 2010.

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

LEVINE, S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Eur. J. Pharmacol**, Amsterdam, v. 405, p.146-160, 2000.

LONNQVIST F., SCHALLING M. Role of leptin and its receptor in human obesity. **Curr Opinion Endocrinol**, v.4, p.164-71, 1997.

LOTGERING FK, GILBERT RD, LONGO LD: Exercise responses in pregnant sheep: Oxygen consumption, uterine blood flow, and blood volume. **J Appl Physiol**, v.55, p. 834-841, 1983.

LOUCKS A.B, VERDUN M, HEATH E.M. Low energy availability, not stress of exercise, alters LH pulsatility in exercising women. **J Appl Physiol**, v.84, p.37–46, 1998.

LUNDBERG, U. Catecholamines. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress*. **New York: Academic Press**, v. 1, p. 408-413, 2000.

LYNCH VJ, BRAYER K, GELLERSEN B, WAGNER GP. HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes. **Plos One**, v.4, 2009.

McEWEN, B. S. Definitions and concepts of stress. In: MEANEY M.J. Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions, **Child Dev**, v.81, p.41–79, 2010.

McEwen, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v.87, p.873–904, 2007.

McEwen, B.S. Stress and the aging hippocampus. **Fron. Neuroendocrin**, v.20, p.49-70, 1999

MALLIDI TV, CRAIG LE, SCHLOEMANN SR, RILEY JK. Murine endometrial and decidual NK1.1+ natural killer cells display a B220+CD11c+ cell surface phenotype. **Biol Reprod**, v.81, p.310–318, 2009.

MANASTER, I, *et al.* Endometrial Nk cells are special immature cells that away pregnancy. **Journal of Immunology**, v.181, p.1869-1876, 2008.

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

MATTHEWS S.G, PHILLIPS D.I.W. Minireview: transgenerational inheritance of the stress response: a new frontier in stress research, **Endocrinology**, v.151, p.7–13, 2010.

MASON, J. W. A review of psychoendocrine on the pituitary-adrenal cortical system. **Psychosom. Med**, Baltimore, v. 30, n. 5, p. 576-607, 1968a.

M.J. MEANEY, Epigenetics and the biological definition of gene _ environment interactions, **Child Dev**, v.81, p.41–79, 2010.

MEDINA, K. L., AND P. W. KINCADE.. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.5382,1994.

MICHEL FERIN. Stress and the Reproductive System. Knobil and Neill's **Physiology of Reproduction**, Third Edition. 2006.

MICHELLE MOTTOLA. Use of Animal Models in Exercise and Pregnancy **Research.Seminars in Perinatology**, v.20, No 4, p 222-231,1996.

MICHIE, A. M., *et al.* Clonal characterization of bipotent T cell and NK cell progenitors in the mouse fetal thymus. **J. Immunol**, v.164, p.1730, 2000.

MILLER, D. B. AND O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. **Metabolism**, v.51, p.5–10. 2002.

MOORE, K.W. *et al.* Annual. **Review Immunol**, v.19, p.683, 2001.

MORETTA L, *et al.* Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. **Immunol Rev**, v.214, p.219-28, 2006.

MORRIS S.N., *et al.* Effects of lifetime exercise on the outcome of in vitro fertilization. **Obstet Gynecol**, v.108, p.938–945, 2006.

MUKHTAR, D.D.Y.; STEWART, I.J.; CROY, B.A. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. **J. Reprod. Immunol**, v.15, p.269-279, 1989.

MURPHY SP, *et al.* Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. **Am J Obstet Gynecol**, v.200, p.308.e1-9, 2009.

NAKAMURA K, SHEPS S, ARCK PC. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. **J Ass Reprod Gen**, v.25, p.47–62, 2008.

ORR. M.T, LANIER L.L. Natural killer cell education and tolerance. **Cell. Sep**, v.17, vp.847-56, 2010.

PACE, L MORRISON, J N BULMER. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy. **J Clin Pathol**, v.42, p.35-39, 1989.

PAFFARO JR, *et al.* Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells By DBA Lectin Reactivity. **Placenta**, v.24, p.479-88, 2003.

PALMER SM, OAKES GK, CHAMPION JA, *et al.*: Catecholamine physiology in the ovine fetus. III. Maternal and fetal response to acute maternal exercise. **Am J Obstet Gynecol**, v.149, p.426-434, 1984.

PARKER VJ, DOUGLAS AJ. Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects. **J Reprod Immunol**, v.85, p.86-92, 2010.

PARR, E.L.; PARR, M.B.; YOUNG, J.D-E. Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. **Biol. Reprod**, v.37, p.1327-1336, 1987.

PARR, E.L.; SZARY, A.; PARR, M.B. Measurement of natural killer activity and target cell binding by mouse metrial gland cells isolated by enzymic or mechanical methods. **J. Reprod. Fertil**, v. 88, p. 283-294, 1990 (b).

PEDERSEN, B. K. e H. ULLUM. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. **Med. Sci. Sports Exerc**, v.26, p.140-146, 1994.

PEEL S. Granulated Metrial Gland Cells. New York: **Springer-Verlag**, p.1-112,1989.

PEEL, S.; STEWART, I; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. **Cell Tissue Res**, v.223, p.647-656, 1983.

PICKERING, A. D. The concept of biological stress. In: *Stress and fish*. **New York: Academic Press**, p.225-255,1981.

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**, v.47, p.242-50, 2002.

POLGÁR B, NAGY E, MIKÓ E', VARGA P, SZEKERES-BARTHÓ J. Urinary PIBF (Progesterone Induced Blocking Factor) concentration is related to pregnancy outcome. **Biol Reprod**, v.71, p.1699–1705, 2004.

PRIOR J. Estrogen's storm season. Centre for menstrual cycle and ovulation research. Vancouver: University of British Columbia and VCHRI; 2005.

RAJ RAI *et al.* Immunology of tuberculosis. **The Indian Journal of medical research**, v.120, p.213-232, 2004.

REDLINE, R. W. And LU, C. Y. Localization of fetal Major Histocompatibility Complex Antigens and Maternal Leucocytes in Murine Placenta: Implications for Materno-fetal Immunological relationship. **Laboratory Investigation**, v.61, p. 27-36, 1989.

RICH-EDWARDS J.W., *et al.* Physical activity, body mass index, and ovulatory disorder infertility. **Epidemiology**, v.13, p.184–190, 2002.

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

ROMAGNANI C, *et al.* CD56brightCD16 – killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. **Journal of Immunology**, v.178, p.4947–4955, 2007.

SAAVEDRA J. M., *et al.* J. Brain Angiotensin II, an Important Stress Hormone: Regulatory Sites and Therapeutic Opportunities. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2004.

SALAMONSEN L.A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endocrinology. **Trends Endocrinol Metab**, v.7, p.28–34,1996.

SARAH K. *et al.* Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. **Stress**, v.11, p.425–437, 2008.

SASAKI, K., AND T. ITO.. Effects of pregnancy and lactation on the peripheral lymphatic tissue in the mouse: qualitative and quantitative morphology. **Arch. Histol. Jpn**, v.43, p.423, 1980.

SELYE H. Studies on the Physiology of the Maternal Placenta in the rat. **Placenta**. 1935.

SELYE H. The effect of adaptation to various damaging agents on the female sex organs in the rat. **Endocrinology**, v.25, p.615-24,1939.

SHAUN P. *et al.* Uterine NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. **The Journal of Immunology**, p.4004-4090, 2005.

SHAWN P. *Met al.* Interferon Gamma in Successful Pregnancies. **Biology of Reproduction**, v.80, p.848–859, 2009.

SMITH S.D, *et al.* Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. **Am J Pathol**, v.174, p.1959–1971, 2009.

SMITH, L.J. Metrial gland and other glycogen containing cells in the mouse uterus following mating and through implantation of the embryo. **Am. J. Anat**, v.119, p.15-24, 1966

SMYTH M.J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v.42, p.501-10, 2005.

SPINNEWIJN W.E., *et al.* Fetal heart rate and uterine contractility during maternal exercise at term. **Am J Obstet Gynecol**, v.174, p.43– 8, 1996.

STAM, R., BRUIJNZEEL, A. W., WIEGANT, V. M. Longlasting stress sensitization. **Eur. J. Pharmacol**, Amsterdam, v. 405, n. 1-3, p. 217-224, 2000.

SZEKERES-BARTHO J, *et al.* Progesterone-treated lymphocytes of healthy pregnant women release a factor inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. **Am J Reprod Immunol Microbiol**; v.9, p.15–18,1985.a

SZEKERES-BARTHO J, HADNAGY J, PACSA A.S.The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. **J Reprod Immunol**, v.7, p.121–128, 1985b.

TABIASCO J, *et al.* Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties – a review. **Placenta**, v.27, p.S34–S39, 2006.

TANNO, A.P, MARCONDES, F.K. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, jul./set., 2002.

TAYADE C, FANG Y, BLACK GP, V A P JR, Erlebacher A, Croy BA. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells. **J Leukoc Biol**, v.78, p.1347-55, 2005.

TIBBETTS, T.A., *et al.* Progesterone receptors in the thymus are required for thymus involution during pregnancy and for normal fertility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.12021,1999.

TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol**, v.47, p.187–376,1989.

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

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**, v.108, p.4078–4085, 2006.

VERMA S, HIBY SE, LOKE YW, KING A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol Reprod**, v. 62, p. 959–968, 2000.

VIEIRA, R., *et al.* Sistema de natação para exercício físico de ratos. **Arq. Biol. Tecnol**, Curitiba, v.31, p.387-394, 1988.

VISHWANATH S. AND RAMPHAL R. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. **Infect. Immunity**, v.45, p.197-202, 1984.

VORHERR H: Factors influencing fetal growth. **Am J Obstet Gynecol**, v.142, p.577-588, 1982.

VOSSHENRICH CA, *et al.* A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. **Nat Immunol**, v.7, p.1217–1224, 2006.

WARBURTON D. *et al.* Health benefits of physical activity: the evidence. **CMAJ**, v.174, p.801–809, 2006.

WHITELAW PF, CROY BA. Granulated lymphocytes of pregnancy. **Placenta**, v.17, p.533–543, 1996.

WILLIAM H. *et al.* Investigation of the teratogenic effects of exercise on pregnancy outcome in mice. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v.7, p. 391–397, 1987.

WIEBOLD J.L., STANFIELD P.H., BECKER W.C., HILLERS J.K. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. **J Reprod Fertil**, v.78, p.185–92, 1986.

WILLIAMS, N. S., *et al.* Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro system. **Immunol. Rev**, v.165, p. 47, 1998.

WILLIAMS N.I., *et al.* Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.5184–5193, 2001.

WOLFE LA, *et al.* Physiological interactions between pregnancy and aerobic exercise, in Pandolf KB (ed): **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.17, p.295-351, 1989.

WOLFE LA, BRENNER IKM, MOTTOLA MF: Maternal exercise, fetal well-being and pregnancy outcome, in Holloszy IO (ed): **Exercise Sports Sciences Reviews**, v. 22. Baltimore, MD, Williams & Wilkins, p.145-194, 1994.

YADI, H., *et al.* Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **J Immunol**, v.181, p.6140–6147, 2008.

YUNOHARA T, ITO M, SAKODA Y., OKAMURA H. The effect of angiotensin II on utero-placental and umbilical circulation in normotensive pregnant women. **International Journal of Gynaecological Obstetric**, v.45, p. 117-123, 1994.

ZHENG,L.M. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. **American Journal of Reproductive immunology**, v.25, p.72-76, 1991.

ZHENG, L.M., *et al.* Immunogold labeling of perforin and serine estearases in granulated metrial gland cells. **FASEB journal**, v.5, p.79-85, 1991.

ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D. E. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol**, v.25, p.72 - 76, 1991.

APÉNDICE

American Society for Reproductive Immunology



Certificate of Award

NIH Travel Award is granted to

Kamilia Rodrigues

30th Annual Meeting

American Society for Reproductive Immunology

May 17-20, 2010

Charles W. King

Charles W. King, PhD
President, ASRI

Jae-Il Park

Jae-Il Park, MD, MPH
Past President, ASRI