

Ministério da Educação
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

ÉRIKA PASQUA TAVARES

***ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DAS CÉLULAS NATURAL
KILLER UTERINAS DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS
TRATAMENTO PRÉVIO COM DANAZOL***

Alfenas - MG
Abril – 2011

ÉRIKA PASQUA TAVARES

***ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DAS CÉLULAS NATURAL
KILLER UTERINAS DE CAMUNDONGOS PRENHES APÓS
TRATAMENTO PRÉVIO COM DANAZOL***

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

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Alfenas - MG

Abril – 2011

Dedico ao meu filho Lucas e aos meus pais Luiz e Sônia pela paciência nestes dois anos; ao meu irmão André Luiz, modelo de serenidade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades da vida...

À Universidade Federal de Alfenas, por possibilitar minha graduação e mestrado.

Ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, através de seu coordenador, professor Dr. Alexandre Giusti Paiva, pelas oportunidades e incentivos à pós-graduação.

Ao prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior, pela experiência e dedicação, exemplo de competência e amor à ciência, revelando-me o significado de ser “altruista”.

À profa. Dra. Andréa Molica do Amarante Paffaro, pelo auxílio durante a realização da pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado Bruno Zavan, Kamila Leite Rodrigues, Daniel Antero de Almeida Gaudino, Anna Cláudia Guimarães Freire, Cláudia de Souza Ferreira, Paula Comune Pennacchi, Mariângela Rodrigues, Luciana Costa Teodoro, Michael Brian Santiago e Ana Laura de Oliveira Carvalho pela companhia nas disciplinas cursadas e nas atividades de laboratório.

Às alunas de Iniciação Científica Évila da Silva Lopes Salles e Patrícia Naiara Tame Lima, pela contribuição imprescindível para a conclusão das atividades práticas.

Aos Funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa Andréa Aparecida dos Santos Mendonça, Fernando Ponciano e Vanuza Aparecida dos Reis, pela atenção e disponibilidade no laboratório.

À CAPES e FAPEMIG, pelos recursos financeiros investidos nesta pesquisa.

Ao supervisor do campus de Varginha – UNIFENAS e coordenador do Curso de Odontologia, prof. Luiz Antônio Sartori, pela amizade, compreensão e incentivo ao meu crescimento profissional.

Aos professores, funcionários e acadêmicos do curso de Odontologia da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Varginha, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Minha eterna gratidão.

“A expectativa dá mais valor às boas coisas da vida. O céu não seria o céu se soubéssemos como ele é.”

(Goethe)

RESUMO

Danazol, um andrógeno sintético, desenvolvido em 1970 para o tratamento da endometriose, tem aplicação controversa no pré-tratamento em mulheres com infertilidade sem causa aparente, abortos recorrentes e que seriam submetidas à fertilização in vitro com transferência de embrião. O conhecimento sobre a atuação deste medicamento sobre a incidência de células uNK, morfologia uterina e etologia após sua administração ainda são muito fragmentados e não conclusivos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos das diferentes concentrações do Danazol no comportamento de camundongos prenhes, bem como, as possíveis alterações na implantação, viabilidade, perda embrionária, morfologia do útero e incidência dos subtipos de células uNK reativos para lectina DBA. Foram utilizadas noventa e três fêmeas da linhagem Swiss, obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, tratadas durante 14 dias por meio de gavagem com água destilada + tween 1% (grupo controle) e com água destilada + tween 1% + Danazol nas concentrações de 0,75; 7,5; e 75 mg/kg. O tratamento nos animais foi suspenso por 4 dias e após este prazo as fêmeas foram acasaladas com os machos. O dia em que foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado o 1º dia de gestação. Os testes comportamentais foram realizados e os animais foram sacrificados no 6º, 8º, 10º, 12º e 15º dia de gestação (ddg). Os resultados obtidos mostraram que danazol na dosagem de 0,75 mg/Kg apresentou efeito ansiogênico em camundongos e diminuiu a retenção de memória de curto prazo no 10º ddg. Na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento da retenção de memória a curto prazo e estado equivalente ao depressivo. A diminuição do tempo de exploração global, à medida que a concentração do hormônio, foi aumentada sugere efeito dose dependente de danazol no estabelecimento de estado de sonolência e apatia em camundongos no 10º ddg. Danazol provocou atraso no período para sucesso da cópula, no entanto, aumentou a taxa de prenhez sem reduzir o número de corpus lúteos em todas as dosagens utilizadas. Nos camundongos tratados com a dosagem 7,5 mg/Kg de danazol foram observadas, a partir do 12º ddg, muitas células grandes e de morfologia equivalente às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos que nutrem a decídua e o embrião, o que sugere que está droga aumenta a invasividade do trofoblasto a partir do período médio da prenhez. Danazol na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento no número de células uNK, enquanto dosagens menores (0,75 mg/Kg) e maiores (75 mg/Kg) causaram diminuição neste número, demonstrando o efeito dose dependente do danazol no número de células uNK. A análise dos diferentes subtipos de uNK no útero mostrou que danazol aumenta a migração destas células, podendo prejudicar a proliferação celular em doses elevadas e acelerar a diferenciação celular em áreas próximas ao embrião.

Palavras-chave: Danazol, reprodução, células uNK, testes comportamentais

ABSTRACT

Danazol, a synthetic androgen, developed in 1970 for the treatment of endometriosis, has a controversial application on the pre-treatment of women with unexplained infertility, recurrent miscarriage, and the ones that would undergo in vitro fertilization with embryo transfer. The knowledge about the way this compound works after its administration on the incidence of uNK cells, uterine morphology and ethology is still incomplete and inconclusive. Our objectives were to evaluate the effects of different concentrations of danazol on the behavior of pregnant mice, as well as possible changes in implantation, viability, embryonic loss, morphology of the uterus and the incidence of DBA lectin-reactive uNK cell subtype. Ninety-three Swiss female mice from Universidade Federal de Alfenas vivarium were treated for 14 days by gavage with either distilled water + 1% Tween (control) or distilled water + 1% Tween + 0.75, 7.5 or 75 mg/kg of Danazol. Females were mated with males after suspension of treatment during four days. Day 1 of gestation was established as the day when the presence of vaginal plug was detected. Behavioral tests were performed and the animals were sacrificed at 6th, 8th, 10th, 12th and 15th gestation days (gd). The data showed that 0.75 mg/kg of danazol caused an anxiogenic effect on mice and decreased the retention of short-term memory in the 10th gd. 7.5 mg/kg of this drug increased the retention of short-term memory and developed a depression-like state on the animals. The fact that gradual increase on hormone concentration caused gradual decrease on the global exploration time suggests a dose-dependent effect of danazol on establishing a state of somnolence and apathy in mice in the 10th ddg. Danazol caused a delay on time of successful mating, however, it increased the rate of pregnancy without reducing the number of corpus luteum in all dosages used. In mice treated with 7.5 mg/kg of danazol, many large cells with a trophoblast-like morphology were observed around vessels that nourish the decidua and the embryo starting at 12nd gd, what suggests that this drug increases the invasiveness of the trophoblast starting in the middle period of pregnancy. 7.5 mg/kg of Danazol increased the number of uNK cells, whereas the lowest (0.75 mg/ kg) and the highest (75 mg / kg) doses caused a decrease in this number, demonstrating a dose dependent effect of danazol on the number of uNK cells. The analysis of different subtypes of uNK cells in the uterus showed that danazol increases the migration of these cells and can also impair cell proliferation on higher doses. It also suggests that danazol can stimulate cell differentiation in areas close to the embryo.

Key words: Danazol, reproduction, uNK cells, behavioral tests

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural de Danazol	15
Figura 2 – Aparatos utilizados para os testes comportamentais.....	24
Figura 3 - Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10º ddg e áreas 1 (A1), 2 (A2) e 3 (A3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células uNK.....	28
Figura 4 – Frequência de entradas nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado.....	29
Figura 5 – Tempo de Permanência nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado.....	29
Figura 6 - Tempo de Permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.....	31
Figura 7 - Tempo de Permanência no braço fechado do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.....	31
Figura 8 – Taxa de Reconhecimento em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.....	32
Figura 9 – Tempo de Exploração Global em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.....	33
Figura 10 – Médias de tempo em que o animal permanecia estático em experimento de nado forçado nos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura11 – Médias de tempo em que o animal permanecia estático em experimento de nado forçado, nos diferentes grupos experimentais e dias de gestação.....	35
Figura 12 - Imagens macroscópicas de úteros de camundongos no 10º, 12º e 15º ddg.....	37
Figura 13 – Média das taxas de implantação total em todos os grupos experimentais.....	38
Figura 14 – Média das taxas de viabilidade embrionária em todos os grupos experimentais.	39
Figura 15 – Média das taxas de perda embrionária nos grupos experimentais em todos os dias de gestação analisados.	39
Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10º ddg.	41
Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 6º ddg.....	43
Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 8º ddg.....	46

Figura 19 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 10º ddg.	47
Figura 20 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 12º ddg.	48
Figura 21 - Representação gráfica da média total de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com Danazol em diferentes concentrações.....	49
Figura 22 - Representação gráfica da distribuição na Área 1 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com Danazol em diferentes concentrações.....	52
Figura 23 - Representação gráfica da distribuição na Área 2 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com Danazol em diferentes concentrações.....	52
Figura 24 - Representação gráfica da distribuição na Área 3 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com Danazol em diferentes concentrações.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo da fertilidade.....	36
---------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1 Células Natural Killer Uterinas.....	04
2.2 Janela de Implantação	11
2.3 Invasão Trofoblástica	13
2.4 Danazol.....	15
2.5 Alterações Comportamentais	17
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivos Gerais.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais.....	21
4.2 Estudos Comportamentais.....	21
4.2.1 Análise de Ansiedade.....	21
4.2.2 Análise de Memória de Reconhecimento de Objetos.....	22
4.2.3 Análise de Depressão.....	23
4.3 Estudo da Fertilidade.....	24
4.3.1 Análise da Taxa de Implantação, Viabilidade e Perda Embrionária.....	25
4.4. Estudo Morfológico, Citoquímico e Estereológico.....	25
4.4.1 Processamento para Embebição em Parafina.....	26
4.4.2 Citoquímica com Lectina DBA (Dolichos Biflorus Agglutinin).....	26
4.5 Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica.....	27
4.5.1 Amostragem	27
4.5.2 Estudo Estereológico.....	27
4.6 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE.....	77

1 INTRODUÇÃO

A gestação, do ponto de vista imunológico, somente é possível porque uma intrincada rede imunorregulatória é disparada com o objetivo único de desenvolver um estado de tolerância materno-fetal e permitir a implantação e manutenção do concepto até que haja condições de sobrevivência fora da cavidade uterina.

Entre os fatores envolvidos nessa complexa rede imunomodulatória para a tolerância e regulação do desenvolvimento fetal e formação da placenta, destacam-se: a influência hormonal sobre o sistema imune materno, o reconhecimento das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade paterno (expressas pelo embrião), as citocinas liberadas no meio, o controle da citotoxicidade direta das células natural killer uterinas (uNK) e atividade das células T regulatórias.

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

Em camundongos, as células uNK proliferam-se 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, com uNK mais 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 caracteriza as formas de diferenciação destas células.

A eficiência na marcação das células uNK, com especificidade comparável à de um anticorpo, se deve à 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.

Entretanto, o exato papel das células natural killer durante os vários estágios da gestação ainda não está totalmente elucidado. Outro ponto importante

em debate, refere-se às influências da alteração no número e maturação das células uNK na infertilidade em modelos experimentais e humanos.

De todas as gestações detectadas clinicamente em humanos, aproximadamente 10 a 15% culminam em aborto durante o primeiro trimestre. Embora em grande parte sejam esporádicos, cerca de 2 a 5% tratam-se de abortos recorrentes. As causas de abortos recorrentes são classificadas como sendo de origens genéticas, endocrinológicas, anatômicas, imunológicas, microbiológicas e ambientais. A etiologia em aproximadamente 50% dos casos dos abortos recorrentes é desconhecida, mas tem sido postulado que uma proporção de 80% dessas perdas recorrentes seja devido a causas imunes.

Danazol, um andrógeno sintético, foi desenvolvido em 1970 para o tratamento da endometriose. Também indicado para tratamento de doença fibrocística de mama e como profilaxia no angioedema hereditário. Sua aplicação no pré-tratamento em mulheres com infertilidade sem causa aparente, abortos recorrentes e que seriam submetidas à fertilização in vitro com transferência de embrião, tem sido discutida na literatura. No Brasil, ainda é escassa a utilização de danazol, até em casos de tratamento da endometriose.

Em pacientes com repetidas falhas nos procedimentos de fertilização in vitro com transferência de embrião, observa-se um aumento na citotoxicidade natural das células natural killer uterinas, o que também pode ser observado em mulheres com aborto recorrente.

Um grande desafio, envolvendo a fisiologia da reprodução é esclarecer os processos de interação entre o embrião e o endométrio materno durante o início da implantação e placentação e como o microambiente uterino participa destes eventos controlados pelo sistema endócrino durante a gestação.

Atuando no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, danazol impede a liberação de gonadotrofinas e liga-se, em uma relação dose-dependente, aos receptores de estrógeno e progesterona nos órgãos alvo.

Em mulheres com infertilidade inexplicada, o uso de danazol, modulando este microambiente uterino, alteraria o recrutamento e maturação das células uNK, tornando-se uma alternativa para os tratamentos em reprodução. Apesar de todo conhecimento a respeito de danazol, suas aplicação e efeitos colaterais, o conhecimento sobre a atuação deste medicamento sobre a incidência de células

uNK, morfologia uterina e etologia após sua administração ainda são muito fragmentados e não conclusivos o que justificou a execução de nossos estudos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células Natural Killer Uterinas

As células natural killer (NK), linfócitos derivados da medula óssea, são um importante componente com atividade citotóxica em resposta imunológica não mediada através da pré-sensibilização por antígenos, atuando na via da resposta imune inata (TRINCHINERI, 1989). Estas células presentes no sangue, em órgãos linfóides e não linfóides originam-se da célula progenitora $CD\ 34^+ IL-2R\beta\text{-chain}^+$ (KALKUNTE et al., 2008). As células Natural Killer periféricas (pNK) compreendem aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos do sangue periférico (COLUCCI et al., 2003). Kirwan e Burshtyn (2006) descrevem as NK como importantes componentes da resistência inata contra vírus, bactérias, certos parasitas e tumores, usando grânulos citoplasmáticos citolíticos e produção de citocinas inflamatórias para mediar suas funções efetoras. 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, participando da regulação do sistema imune adaptativo (SMYTH et al., 2005).

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 et al., 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 $INF-\gamma$. Já as células $CD56^{bright} CD16^-$, perfazem os outros 10% da população de células NK e são produtoras de muitas citocinas incluindo $INF-\gamma$, 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; KALKUNTE et al., 2008). Considerando-se o trato reprodutivo feminino, as células $CD56^{bright} CD16^{dim} CD9^+ CD94^+$ são encontradas nas regiões do endométrio, cervix e tuba uterina. No ectocervix e vagina, as células NK expressam $CD56^{dim} CD16^{bright} CD9^+ CD94^-$ (MSELLE et al., 2007).

No útero gestante dos animais com placentação do tipo hemocorial, ocorre uma migração e acúmulo transitório de linfócitos natural killer (NK), cuja atuação na gestação não está totalmente elucidada. Estas células NK do ambiente uterino (uNK) apresentam comportamento distinto daquelas encontradas no sangue circulante (cNK), constituindo uma sub-população das células NK com expressão gênica específica ditada pelo ambiente uterino gestante (FERRAZ, 2006).

Bulmer e Lash (2005) relataram a presença de células NK no útero de mulheres não gestantes e gestantes. Segundo estes autores, o número de células uNK variava em relação ao ciclo menstrual, com poucas células na fase proliferativa, aumento durante a fase secretória, retornando aos níveis basais durante a menstruação. Com o sucesso da implantação, a população de células NK aumenta muito no primeiro trimestre da gestação, diminuindo ao final do segundo trimestre (KITAYA et al., 2007).

Em humanos, o aparecimento cíclico das células uNK no endométrio não-gestante sugere regulação hormonal (BOUTEILLER e PICCINNI, 2008). Várias observações indicam que a quantidade destas células varia paralelamente com os níveis de progesterona. Nas fases pré-ovulatória, proliferativa (folicular) do ciclo menstrual, poucas, pequenas e agranulares células uNK aparecem no endométrio. Seu número aumenta muito depois da ovulação, sobre a influência dos níveis de progesterona. Na fase lútea, as células uNK proliferam rapidamente e possuem grânulos, sendo encontradas em contato com os vasos espiralados do endométrio. Dois dias antes da menstruação, quando os níveis de progesterona diminuem, as células uNK morrem (MOFFETT-KING, 2002; KING et al., 1998).

No início da gestação ocorrem importantes alterações nas células uterinas. Os fibroblastos endometriais 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, promover a nutrição do embrião e produção de hormônios para a manutenção da gestação (ABRAHAMSOHN, 1983). Paschoaline (2009) relata que durante a decidualização ocorre alteração na expressão de metaloproteases, citocinas, integrinas e complexos moleculares de histocompatibilidade.

Em uma área próxima aos vasos mesometriais, concomitantemente à decidualização, 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 em 1935 e as células que a constituíam foram inicialmente denominadas células granulosas da glândula metrial (PEEL, 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 imunoquímicos com as células granulosas da glândula metrial revelaram a presença de perforina nos grânulos intracitoplasmáticos destas células (PARR et al., 1987, 1990; ZHENG et al., 1991), expressão de CD45 (REDLINE e LU, 1989; PARR et al., 1990), Thy-1 (BERNARD et al., 1978; MUKHTAR et al., 1989; PARR et al., 1990), asialo-GM1 (MUKHTAR et al., 1989) e não expressão de marcadores de linfócitos T e B (WHITELAW 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, ZHENG, 1991).

Tais estudos foram fundamentais para caracterização destas células como pertencentes 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, constituída essencialmente por células natural killer uterinas (CROY et al., 1997).

Em camundongos as células uNK aparecem por volta do 5º dia de gestação, coincidindo com o período de implantação do blastocisto e decidualização do endométrio. Nesse período essas células são raras, pequenas e não apresentam grânulos citoplasmáticos. No 6º ddg estes grânulos podem ser notados. Estes

linfócitos continuam proliferando-se e diferenciando-se no útero durante a gestação, podendo atingir até 50 μm de diâmetro (STEWART e PEEL, 1981), e se distribuem no miométrio e endométrio decidualizado e não decidualizado da região mesometrial de cada sítio de implantação (PAFFARO Jr et al., 2003). As células uNK induzem a produção de interferon γ , perforina e outras moléculas, incluindo fatores angiogênicos (CROY et al., 2003^a, WU et al., 2006).

Corrêa da Silva (1997), para realização de estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus Musculus*) prenhes utilizou a 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 sua forma mais imatura, esférica, pequena, como os linfócitos circulantes, medindo aproximadamente $9 \pm 3 \mu\text{m}$ de diâmetro e desprovidos de grânulos, com poucas organelas, núcleo circular com grande quantidade de cromatina condensada, fortemente positivos para lectina DBA em sua superfície. O subtipo II de uNK consiste em células 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, apresenta células ainda maiores, medindo 26 μm , 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 μm , com inúmeros grânulos positivos à lectina DBA, áreas citoplasmáticas eletrólúcidas, provavelmente devido à 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.

Procurando explicar a origem das células uNK no ambiente uterino em camundongos, Wang et al. (2003) verificaram que, enquanto os vasos sanguíneos de úteros não-prenhes foram negativos para a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), estas eram positivas no útero prenhe. Entretanto, tratamento com anticorpo contra VCAM-1, não diminuiu o número de células uNK. Além disso, mitoses de células uNK eram frequentemente observadas. Estes resultados sugerem que o aumento das células uNK durante a gestação resulta de proliferação local.

Em camundongos as células NK são caracterizadas como CD3⁻ CD122⁺. No útero de camundongos as uNK que se concentram na decídua e no agregado linfóide mesometrial da prenhez, expressam receptores específicos como NKp46 e Ly49 e perdem a expressão de NK 1.1 e DX5. O repertório específico de receptores expressos pelas uNK de camundongos influencia a ativação destas células e seu potencial de adesão ao MHC (YADI et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que, analogamente aos receptores KIR expressos pelas uNK de humanos, os receptores da família Ly49 (*Killer cell lectin-like receptors*) de camundongos reconhecem e se ligam ao MHC-1 e esta associação possibilita a ativação ou inibição da atividade citotóxica (KING et al., 2000; TROWSDALE, 2001; RAULET et al., 2001).

Estas conclusões foram confirmadas por Yadi et al. (2008) que descreveram um distinto repertório de receptores Ly49 expressos pelas células CD3⁻ CD122⁺ NK 1.1⁻ DX5⁻.

Os receptores Ly49 são receptores lecitina tipo II, combinados a moléculas do MHC. A maioria dos receptores Ly49 são inibitórios mas alguns tem potencial de ativação. Estes receptores ativatórios iniciam uma cascata bioquímica disparando a produção de citocinas e citotoxicidade (VAN DEN HEUVEL et al., 2005). A prenhez induz a expressão de receptores Ly49 inibitórios (CROY et al., 2003^a; CROY et al., 2003^b).

Wang et al. (2003) observaram o progressivo aumento em número e tamanho das células uNK com pico no dia 12-14 de gestação na decídua e no agregado linfóide mesometrial. Segundo estes autores, a formação de novos vasos era mais proeminente em torno do dia 8, com pico no 13^o dia de gestação. Além disso, relataram que as células uNK foram frequentemente localizadas próximas aos vasos sanguíneos e expressavam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF),

sugerindo o possível papel indutor de angiogênese durante o desenvolvimento da decídua e do agregado linfóide mesometrial. De acordo com Lash et al. (2006), as células uNK de humanos, roedores e porcos caracterizam-se por sua abundante transcrição de fatores angiogênicos, incluindo VEGF-C, fator de crescimento da placenta (PlGF), angiopoitina 1, angiopoitina 2 e TGF- β 1. Estudos in vivo e in vitro, realizados em ratos e camundongos por Hanna et al. (2006) demonstraram que a liberação de fatores angiogênicos depende de interações com receptores específicos das uNK.

Estudos recentes realizados por Croy et al. (2010), têm procurado caracterizar esta abundante e transitória população de células NK, através do desenvolvimento de métodos de isolamento e cultura de células uNK, extração de RNA e citometria de fluxo. Com estas técnicas procurou-se identificar as propriedades angiogênicas especiais das células uNK e sua relação com alterações fisiológicas normais na circulação arterial uterina e geral, responsáveis pelo sucesso da gestação (CROY et al., 2010; BURKE et al., 2010).

É clara a influência de hormônios esteróides como progesterona e estrógeno, no recrutamento das células NK (DOSIOU e GIUDICE, 2005). A progesterona age estimulando a produção de MIP-1 β , que por sua vez influencia a migração das células NK para o útero (KITAYA et al., 2003). A progesterona também tem influência na produção de VEGF (POPOVICI et al., 2000) e na expressão de moléculas de adesão como a L-selectina e integrina α -4 (CHANTAKRU et al., 2003).

A migração dos linfócitos de órgãos linfóides para a circulação, seguindo para os tecidos, é orquestrada por uma série de interações entre o tecido específico que secreta quimiocina e seus receptores expressos por subtipos de linfócitos (CAMPBELL e BUTCHER, 2000). No útero de humanos, várias quimiocinas são produzidas principalmente pelas células decidualizadas e dos vasos sanguíneos do estroma, leucócitos deciduais e citotrofoblasto (RED-HORSE et al., 2004). Dentre as quimiocinas encontradas, destaca-se a MIP - 1 β , também chamada CCL4 (MAURER e VON STEBUT, 2004). No útero, a MIP - 1 β tem como fonte as células do estroma e sua produção estimulada pela progesterona (KITAYA et al., 2003).

King et al. (1996) estudando a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em leucócitos da mucosa uterina, não observaram nenhum destes receptores em macrófagos e nas células natural killer uterinas. Os autores concluem

que apesar da acumulação e sobrevivência das células uNK terem dependência hormonal, estes efeitos devem ser indiretos.

Borzychowski et al. (2003) também observaram ausência de expressão de α e β -ER (receptores de estrógeno) através de RT-PCR em células NK isoladas do útero de camundongos. Entretanto, estudo realizado por Henderson et al. (2003) demonstraram que as células uNK expressam tanto mRNA quanto a proteína ER β 1 e GR (receptores para estrógeno do tipo β 1 e para glicocorticóides). Recentes estudos realizados por Kuang et al. (2010), procuraram explicar a regulação hormonal das células natural killer uterinas no útero de camundongos no período pre-implantacional. Os resultados destes autores mostraram que as células precursoras das uNK ou seus específicos componentes de membrana devem ser recrutados pelo útero através da influência de estrógeno e/ou progesterona e seus efeitos podem ser completamente abolidos por antagonistas específicos de seus receptores nucleares (receptores para estrógeno e progesterona).

Tem sido demonstrado por vários autores que a progesterona adere-se aos receptores das células do estroma uterino aumentando a secreção de IL-15 (LOKE e KING, 1995). IL-15 é um produto das células do estroma uterino tanto em humanos quanto em camundongos durante a decidualização (OKADA et al., 2000; DUNN et al., 2002; ARCK et al., 2007).

Estudos realizados por Keskin et al. (2007) mostraram que TGF β favorece a conversão de células NK periféricas (pNK) CD16⁺CD9⁻ em células CD16⁻CD9⁺ semelhantes às uNK. Os autores discutem que a decídua também contém células progenitoras capazes de adquirirem o fenótipo das uNK. Pode-se concluir, portanto, que tanto as células CD16⁺ periféricas ou os progenitores da decídua, ou ambos, são os possíveis precursores das células uNK. Apesar das dúvidas existentes sobre os verdadeiros precursores das uNK, o estudo sugere que TGF β possui um importante papel influenciando o fenótipo das uNK.

Recentes estudos conduzidos por Kane et al. (2009) demonstraram que a gonadotrofina coriônica (hCG), hormônio sintetizado pelo trofoblasto atua como um regulador da proliferação das uNK. A influência do hCG sobre as células uNK é mediada por um receptor de manose (MR, CD206). MR e hCG foram encontrados nos mesmos locais na superfície das uNK e a proliferação destas células não ocorreu quando foram incubadas com hCG-diglicosilado ou hCG intacto na presença de excesso de D-Manose. Estas novas observações confirmam a relação entre hCG

e as células NK durante a gravidez e podem ser o foco de futuras intervenções terapêuticas.

2.2 Janela de Implantação

A implantação é um processo complexo, onde um embrião semi-alogênico precisa ser aceito pelos tecidos maternos, invadindo-os para ter acesso a nutrientes, essenciais para sua sobrevivência e desenvolvimento. Para que isto aconteça é necessária uma extensa preparação e uma comunicação bidirecional entre o blastocisto e os tecidos endometriais (VAN MOURIK et al., 2009).

Na região endometrial, a preparação para a implantação é necessária, sendo chamada janela de implantação. Neste período, o útero é preparado para receber o blastocisto e observa-se a presença de células do sistema imune, citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão (KAMMERER et al., 2004; DIMITRIADIS et al., 2005). Conforme Sarafana et al. (2007), durante a gravidez, o sistema imunológico materno é ativo e funcional. Existem diversos mecanismos subjacentes à tolerância materna do feto que permitem a implantação e a gestação bem sucedida. A expressão de moléculas de HLA-G, HLA-E e HLA-C nas células do trofoblasto, o controle da atividade citolítica das NK através de receptores inibitórios, a expressão de proteínas reguladoras do complemento, a regulação do recrutamento de leucócitos e proliferação celular na interface materno-fetal e a supressão de linfócitos Th1 na decídua parecem ser constituintes essenciais do fenômeno de tolerância imunológica que ocorre entre o feto e a mãe durante a gestação.

Um endométrio funcional é necessário para o sucesso da implantação. Na fase proliferativa, mediada pelo estrogênio, a preparação acontece. Na fase secretória, a janela de implantação é estabelecida através da ação da progesterona sobre o endométrio preparado pelo estrogênio. A preparação do endométrio consiste na expressão de numerosos receptores e moléculas de adesão, além da produção de citocinas e outros mediadores. O processo de implantação engloba vários estágios distintos: aposição, adesão, penetração e invasão trofoblástica (JABBOUR et al., 2006).

Um passo importante para o estabelecimento da gestação é a decidualização, que é um processo no qual o endométrio sofre grandes alterações em sua morfologia, expressão e secreção de mediadores químicos que permitirão a implantação do blastocisto (KING, 2000). Em humanos, a decidualização acontece na ausência do embrião e se há falhas na implantação deste, a menstruação ocorre. O processo de decidualização é induzido em grande parte pela progesterona. (GELLERSEN e BROSENS, 2003; BRAR et al., 1997).

O estabelecimento da janela de implantação está sob controle dos hormônios esteróides. Entretanto, esta regulação hormonal varia em diferentes espécies. Em camundongos e ratos, o estabelecimento da janela de implantação requer a presença de estrógeno e progesterona. Entretanto, estrógeno não é necessário em porcos e coelhos (KIMBER, 2005; DEY et al., 2004). Em humanos, segundo Jabbour et al.(2006), um endométrio preparado pelo estrógeno desenvolve-se com a ação da progesterona.

Segundo Aghajanova et al. (2008), o sucesso da implantação embrionária é um evento crucial para a reprodução humana natural e assistida. A implantação do blastocisto é um processo dinâmico, envolvendo aposição do embrião, adesão e invasão do estroma endometrial. Na fertilização in vitro (IVF), falhas na implantação podem ocorrer devido a vários fatores, incluindo anormalidades cromossômicas e um desenvolvimento inapropriado do endométrio (LOKE et al., 1995; SZCZYGIET e KURPISZ, 2003; VOULLAIRE et al., 2002; LEVI, et al., 2004). Sabe-se que embriões não conseguem implantar-se em um endométrio pouco maduro, e isto é a causa de baixas taxas de implantação em casos de transferência de embriões de boa qualidade (VALBUENA et al., 1999).

Deve-se ressaltar o papel das células uNK na produção de citocinas e outros componentes imunológicos que preparam o útero para a implantação. Em estudo realizado por Kuang et al. (2010) foi demonstrado que o precursor das células uNK ou seu componente específico é expresso dinamicamente no utero durante o período pre-implantacional, sobre a regulação de estrógeno e progesterona através de seus receptores nucleares. Os resultados destes autores demonstraram que a regulação hormonal antes da implantação do embrião é necessária para a migração de precursores de células uNK (ou seu componente específico) para o útero.

2.3 Invasão Trofoblástica

Em humanos, durante o primeiro trimestre da gestação, a placenta está em um processo de construção de sua arquitetura. A principal célula do estroma placentária, o trofoblasto, deve formar e ancorar pilares de tecido fetal (vilos), enquanto simultaneamente esculpe um ambiente de lacunas entre os vilos (espaço interviloso). Quando encontra seu caminho na decídua, próximo às artérias espiraladas maternas, estabelece-se uma importante “linha da vida” de vasos no interior das lacunas. O processo de invasão consiste na habilidade das células em degradar tecidos vizinhos, a matriz extra-celular. As células trofoblásticas são capazes de produzir matriz-metaloproteinases (MMPs) e outras proteases. Este método é similar àquele usado pelas células tumorais (FITZGERALD et al., 2006).

De acordo com Alves et al. (2003), durante o início da gravidez humana, os citotrofoblastos extravilosos invadem o útero e transformam as artérias espiraladas em grandes vasos de baixa resistência. A inadequada invasão das artérias espiraladas por estes trofoblastos extravilosos resulta em isquemia placentária e no desenvolvimento de complicações obstétricas como pre-eclâmpsia e a restrição do crescimento fetal intra-útero.

O sucesso da implantação em humanos é altamente dependente de uma coordenada diferenciação das células do estroma endometrial em células deciduais e das células trofoblásticas em sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto extraviloso invasivo (EVTs) (GODBOLE et al., 2011). O citotrofoblasto extraviloso é importante porque é responsável pela ancoragem para o desenvolvimento do embrião e regula as alterações que ocorrem na circulação materno-fetal durante o início da gestação (PIJNENBORG, 1998; CHADDHA et al., 2004). Alterações neste processo de invasão está usualmente associada com perdas ou complicações gestacionais (McMASTER et al., 2004; WELLS, 2007). Vários estudos in vitro com culturas celulares tem demonstrado que o citotrofoblasto extraviloso age invadindo a decídua, as artérias espiraladas e o epitélio glandular (HELIGE et al., 2008; MOSER et al., 2010). Os EVT's ativam seu potencial invasivo através da produção de altas quantidades de matrix-metaloproteinases (MMPs) (LIBRACH et al., 1991; STAUN-RAM e SHALEV, 2005). Em adição, a decídua produz inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que antagonizam a atividade proteolítica das MMPs,

criando uma barreira física e bioquímica que limita a invasão (DIMITRIADIS et al., 2005).

Estudos realizados por Albrecht et al. (2006), usando o babuíno como modelo de estudo, mostraram a supressão pelo estrógeno da invasão pelo trofoblasto extraviloso (EVT) das artérias espiraladas uterinas no primeiro trimestre da gestação. De acordo com Bonagura et al. (2008), os mecanismos e fatores que modulam e regulam a indução pelo estrógeno da invasão das artérias uterinas pelo EVT ainda não estão totalmente esclarecidos.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é expresso pelo EVT nos vilos de ancoragem e o citotrofoblasto liga-se ao fms-like (FLT1) expresso pelo endotélio vascular da placenta e pelas células do trofoblasto viloso e extraviloso (AHMED et al., 1995). VEGF pode ser sequestrado e inativado por um receptor de FLT1 (sFLT1), expresso pela placenta. Na preeclampsia, que está associada com rudimentar invasão vascular (BROSENS et al., 1972), há baixa expressão de VEGF pelo EVT e alta expressão de SFLT1 pela placenta (ZHOU et al., 2002; LEVINE et al., 2004). Estes e outros estudos in vitro tem mostrado que VEGF tem papel importante em promover a migração do EVT e a invasão das artérias espiraladas (APLIN et al., 2000; ZHOU et al., 2002; ZHOU et al., 2003). Estrógeno aumenta a expressão de VEGF pelo epitélio glandular e células do estroma do útero de babuínos (NIKLAUS et al., 2003; ALBRECHT, 2003), ovelhas (REYNOLDS et al., 1998) e ratos (CULLINAN-BOVE e KOOS, 1993). Em estudo realizado por Bonagura et al. (2008) foi demonstrada que a expressão de mRNA para VEGF pelo EVT placentária foi eliminada, e os níveis de sFLT1 (responsável pela bioavaliabilidade de VEGF) na veia uterina estavam aumentados em babuínos onde a invasão das artérias espiraladas uterinas estava diminuída com o aumento dos níveis de estrógeno no primeiro trimestre da gestação. Os autores concluíram que VEGF controla a diminuição da invasão das artérias espiraladas pelo EVT quando induzido pelo estrógeno. Resta considerar que os baixos níveis de estrógeno endógeno no início da gestação permitem normal invasão das artérias espiraladas pelo EVT e o aumento dos níveis de estrógeno com o avanço da gestação tem um importante papel fisiológico na regulação da extensão desta invasão.

2.4 Danazol

Danazol é um esteróide sintético derivado da etisterona. É um pó cristalino branco ou amarelo pálido, insolúvel em água e moderadamente solúvel em álcool. Apresenta-se quimicamente representado por 17 α -Pregna-2,4-dien-20-yno [2,3-*d*]-isoxazol-17-ol, com fórmula molecular C₂₂H₂₇NO₂ e peso molecular 337.46 (SANOFI-SYNTHELABO, 1996). A fórmula estrutural pode ser observada na **Figura 1**.

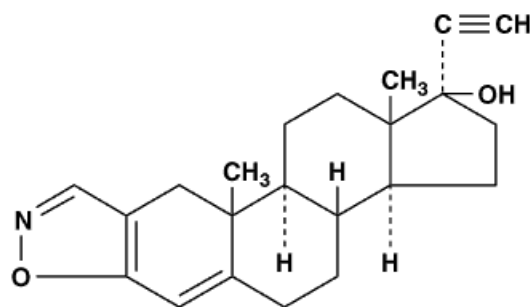


Figura 1 – Fórmula estrutural de Danazol. Fonte: SANOFI-SYNTHELABO (1996)

De acordo com Dmowski (1990), danazol é um agente terapêutico usado no tratamento de endometriose e alguns tumores benignos de mama, diminuindo a liberação de gonadotrofinas e inibindo a adrenal através da supressão de várias enzimas. Também tem sido indicado para prevenção de angioedema hereditário (BORK et al., 2008).

Vários estudos relatam que danazol melhora as condições imunológicas locais no útero (DMOWSKI, 1990; OTA et al., 1996; KUSAKABE et al., 2007), aderindo-se diretamente aos receptores para estrógeno e progesterona no tecido endometrial. Utilizado no pré-tratamento à fertilização in vitro e transferência de embriões (IVF-ET) tem sido eficaz, aumentando seu sucesso (TEI et al., 1998). Entretanto, pouco é conhecido sobre o mecanismo de atuação do danazol que se traduz em sua eficácia no aumento da fertilidade. Em pacientes com freqüentes falhas na IVF-ET existe um evidente aumento da citotoxicidade das células natural killer dentro do endométrio (FUKUI et al., 1999). Esta citotoxicidade aumentada foi também observada em pacientes com aborto recorrente (AOKI et al., 1995). Estudos em ratos com endometriose induzida têm mostrado que o efeito terapêutico de

danazol inibe o crescimento ectópico de tecidos uterinos, acompanhado pela normalização do número de células natural killer (MATSUBAYASHI et al., 1995).

Devido a sua pouca solubilidade em água e sua baixa biodisponibilidade (HOOPER et al., 1991), danazol é usualmente administrado em doses relativamente altas, em torno de 200 a 400 mg. Além disso, pela supressão da produção de esteróides pelo ovário causando baixos níveis de estrógeno e altas doses de andrógenos, muitos efeitos colaterais são observados, como: ganho de peso, virilismo, acne, hirsutismo e diminuição na mineralização óssea (DODIN et al., 1991; BADAWY et al., 1996). Barbieri e Ryan (1981) também relataram ganho de peso devido à sua atividade anabolizante/androgênica, bem como, metabolismo lipídico anormal, disfunção hepática, e trombose cerebral. Segundo Katsuki et al. (1998) danazol estimula a reabsorção óssea em ratos com endometriose. Devido aos intensos efeitos colaterais, alguns autores (HUGHES et al., 2009) não indicam danazol para mulheres com infertilidade inexplicada. Entretanto, Brown et al. (2010) revelaram a mesma eficácia de danazol na diminuição da dor relacionada à endometriose e com efeitos colaterais menores que os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRHAs) utilizados atualmente com mais frequência no tratamento da endometriose.

Vários efeitos farmacológicos de danazol têm sido relatados, incluindo inibição da liberação de gonadotrofinas, inibição competitiva de enzimas esteroidogênicas, modulação de funções imunológicas e supressão de proliferação celular (FRANCHIMONT e CRAMILION, 1977; BARBIERI et al., 1977; ROSE et al., 1988; VIGANO et al., 1994).

Mukarami et al. (2006) mostraram que danazol inibe competitivamente a atividade da aromatase em experimento com cultura de células retiradas de pacientes com endometriose, submetidos a laparoscopia. O estudo também demonstrou que danazol não afeta o mRNA ou os níveis de aromatase, indicando a eficácia de aplicações locais de danazol nas lesões endometrióticas.

Em estudos *in vitro*, danazol exibe efeitos antiproliferativos nas células endometriais quando em cultura com monócitos do sangue periférico, na presença de estrógeno ou de proteínas da matriz extracelular (SURREY e HALME, 1992; NEGAMI et al., 1993). Foi demonstrado por Thomas et al. (2007) que danazol exibe uma forte habilidade para diminuir a proliferação de células endoteliais induzidas por

soro fetal bovino e alguns fatores de crescimento implicados na iniciação e progressão da angiogênese.

Danazol adere-se com diferentes afinidades aos receptores de hormônios esteróides incluindo glicocorticóides, progesterona, estrógeno e andrógenos (TAMAYA et al., 1984).

Musich et al. (1981) sugerem que os efeitos de danazol sobre os receptores de estrógeno tem mecanismo de ação nos tecidos alvo, dose (ou duração de tratamento) dependente. Baixas doses de danazol, mesmo que por períodos prolongados, não alteram significativamente o metabolismo e apresentam menores efeitos colaterais (De LEO et al., 1997). Entretanto, conforme estudos de Morgante et al. (1999), nestas doses menores (100 mg/kg/dia), danazol não se liga aos receptores de estrógeno, mas se liga estavelmente aos receptores para andrógenos e progesterona, diminuindo os efeitos do estrógeno, impedindo a proliferação dos tecidos endometrióticos e reduzindo a dor do paciente.

Estudo realizado por Kusakabe et al. (2007) demonstrou que o tratamento de camundongos com danazol provocou um aumento na expressão nos genes para Ly49A, Ly49C, integrina $\alpha 5$ e M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófago), no útero de camundongos do 1º ddg, sugerindo que a atuação de danazol na promoção da gravidez se deve ao recrutamento das células *uNK*. Takei et al. (1997) já haviam observado que o tratamento com danazol reforçava a expressão dos níveis uterinos de Ly49A e Ly49C e estes achados indicavam que muitas células NK estavam presentes no útero.

2.5 Alterações Comportamentais

O eixo neuroendócrino relacionado ao ciclo reprodutivo feminino é vulnerável a mudanças e sensível a fatores psicossociais, ambientais e fisiológicos. Alterações como o transtorno disfórico pré-menstrual, a depressão pós-parto e os transtornos do humor relacionados à perimenopausa ou menopausa podem estar relacionadas a mudanças influenciadas por hormônios na função neurotransmissora (STEINER et al., 2003).

Dmowski (1990) relatou uma “pseudomenopausa”, resultado da supressão ovariana causada por danazol. Efeitos como calores, depressão, alterações de humor também já foram relatados após uso de danazol (HUGHES et al., 2009).

Durante a gravidez há uma enorme produção de hormônios sexuais e não sexuais pela placenta, que trazem mudanças orgânicas e comportamentais também significativas. A gravidez é conhecida pelo forte componente de ambivalência e regressão psicológica. Estas manifestações psíquicas se manifestam em maior ou menor grau por sintomas orgânicos determinados pela nova situação hormonal. A presença de náuseas e vômitos nos três primeiros meses é considerada normal e causada por efeito do aumento exagerado na produção das gonadotrofinas coriônicas e estrógenos. Porém o grau de manifestação destes sintomas é fortemente influenciado pela situação emocional da gestante (BARINE, 1994).

Estudos com modelos de testes comportamentais que identificam ansiedade sugerem importante influência dos hormônios ovarianos (BROT et al., 1995; LUCION et al., 1996). Além destes, diversos estudos sobre a influência dos hormônios gonadais sobre respostas cognitivas e mnemônicas em fêmeas são relatados na literatura (BERMAN, 1997; GIBBS e GABOR, 2003; KEENAN, 2001; KOROL, 2004).

Desordens depressivas afetam com maior intensidade as mulheres após a menarca e isto ocorre devido à influência dos hormônios ovarianos e às mudanças de seus níveis durante o ciclo reprodutivo da mulher (KESSLER et al., 1993; WEISSMAN et al., 1993; ANGOLD e WORTHMAN, 1993; WILLIAMS et al., 1995). Alonso et al. (1991) não encontraram diferenças no tempo de imobilização em experimento de nado forçado entre ratos fêmeas durante as diferentes fases do ciclo estral. Entretanto, Marvan et al. (1996) relataram um aumento no tempo de imobilização neste experimento durante o diestro quando comparado ao estro.

Não existem na literatura dados sobre as alterações comportamentais durante a gestação em fêmeas de camundongos submetidas ao tratamento prévio com danazol.

Fêmeas de mamíferos produzem baixos níveis de andrógenos, quando comparadas aos machos da mesma espécie e, portanto, pouca atenção é dada ao estudo dos efeitos de andrógenos no eixo reprodutivo feminino. Estudo de revisão realizado por Foecking et al. (2008) procurou demonstrar os efeitos da exposição de ratas aos andrógenos em três estágios de desenvolvimento (fetal, pós-natal e

adulto) Estes autores sugerem que andrógenos podem causar modificações epigenéticas em genes alvo de estrógeno no cérebro.

Andrógenos ligam-se ao receptor de andrógenos, um ligante citossólico ativador de fatores de transcrição que influenciam o desenvolvimento (HEBBARD et al., 2003) e também modificam a fisiologia e o comportamento na adolescência (FRYE e SELIGA, 2001).

Em roedores, variações do nível dos andrógenos modulam a memória espacial e os animais precisam usar uma nova informação espacial que é aprendida em cada teste (SPRITZER et al., 2008). A castração também prejudica os testes com o labirinto em T (KRITZER et al., 2001). Utilizando 17 β -estradiol os resultados foram opostos, sugerindo que o efeito é androgênico e não estrogênico (KRITZER et al., 2001; GIBBS, 2005). Castração também aumenta os erros nos testes de memória (SPRITZER et al., 2008). Andrógenos podem também modular outros padrões de comportamento tais como a ansiedade e memória de fuga em ratos (FRYE e LACEY, 2001).

Os efeitos dos andrógenos parecem estar limitados a certos domínios cognitivos, especialmente à memória espacial, mas esta hipótese ainda permanece indefinida. Benice e Raber (2009) testaram camundongos castrados comparados a um grupo controle (cirurgia, sem castração) através de vários testes comportamentais tentando responder como os andrógenos afetam múltiplos ou específicos domínios cognitivos em camundongos machos. Estes autores observaram que a castração prejudica os testes com memória espacial. Em contraste, a castração não teve efeito nos testes de memória para reconhecimento de objetos, coordenação motora ou memória passiva de fuga. A castração aumentou a ansiedade, o que foi observado no teste de abertura de campo. Os autores concluem que os andrógenos afetam especificamente a memória espacial e os processos neurobiológicos em torno da formação desta memória devem ser diferentemente afetados pelos andrógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de danazol no comportamento de camundongos prenhes, bem como as possíveis alterações na implantação, viabilidade, perda embrionária, morfologia do útero e incidência dos subtipos de células uNK reativos para lectina DBA, por meio de estudos etológicos, morfológicos, citoquímicos e estereológicos.

3.2 Específicos

- Avaliar as alterações comportamentais dos camundongos tratados com danazol com o intuito de identificar atividade ansiolítica (labirinto em cruz elevado), atividade antidepressiva (nado forçado) e teste de memória (teste do reconhecimento espontâneo de objetos).
- Analisar os efeitos de danazol na taxa de implantação, viabilidade e perda embrionária de camundongos.
- Analisar a morfologia do útero e as características das células uNK de camundongos tratados com danazol.
- Avaliar a expressão de N-Acetil-Galactosamina nas células uNK em camundongos tratados com danazol e a possível alteração no padrão de reatividade da lectina DBA nestas células.
- Analisar a distribuição dos 4 subtipos de células uNK e quantificá-los em três áreas do útero prenhe de camundongos tratados com danazol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas noventa e três fêmeas da linhagem Swiss, obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, tratadas durante 14 dias por meio de gavagem com água destilada + tween 1% (grupo controle) e com água destilada + tween 1% + danazol nas concentrações de 0,75 ; 7,5; e 75 mg/kg. O tratamento nos animais foi suspenso por 4 dias e após este prazo as fêmeas foram acasaladas com os machos (modificado de KUSAKABE et al., 2007). O dia em que foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado o 1º dia de gestação. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UNIFAL-MG.

4.2 Estudos Comportamentais

Os animais tratados com danazol e o grupo controle foram submetidos aos testes comportamentais no 6º, 8º, 10º, 12º e 15º ddd. Estes testes tiveram o intuito de identificar a atividade ansiolítica (labirinto em cruz elevado), teste de memória (teste do reconhecimento espontâneo de objetos) e atividade antidepressiva (nado forçado). Os testes foram realizados no período da manhã e com horário e duração padronizados. Foram realizados, respectivamente, o teste do labirinto em cruz seguido do teste de reconhecimento de objetos e, finalmente, o teste de nado forçado.

4.2.1 Análise de ansiedade

O labirinto em cruz elevado é um método bem conhecido para detectar o efeito de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas (FILE, 2001) e foi usado como modelo de avaliação de ansiedade nesse estudo. O teste do labirinto em cruz elevado foi executado em um aparato (**Figura 2A**) com dois braços abertos (30 x 5 cm cada), dois braços fechados (30 x 5 x 15,25 cm cada) e uma plataforma central (5 x 5 cm

formando uma cruz suspensa à 40 cm de altura. Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

4.2.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos

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

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

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

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

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

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

$$\text{H} = ([\text{A1} + \text{A2}] - [\text{B} + \text{A3}])$$

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

$$\text{R} = \text{B} - \text{A3} / \text{B} + \text{A3}$$

4.2.3 Análise de depressão

Para detectar o efeito antidepressivo foi utilizado o teste do nado forçado. Este teste foi desenvolvido por Porsolt et al. (1977) para a pesquisa com drogas antidepressivas. Portanto, foi utilizado um cilindro vertical de vidro, com dimensões de 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, preenchido com água à 30°C até a altura de 20 cm (**Figura 2D**). O volume de água deve permitir que o animal possa nadar ou boiar sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Para o teste, cada camundongo foi colocado no cilindro por 6 minutos e foi avaliado o tempo de latência com que o animal exhibe o comportamento de boiar e o tempo total boiando (tempo em que o animal faz pequenos movimentos somente para manter a cabeça acima do nível da água). Somente os 4 últimos minutos foram analisados, de acordo com a metodologia de Porsolt.

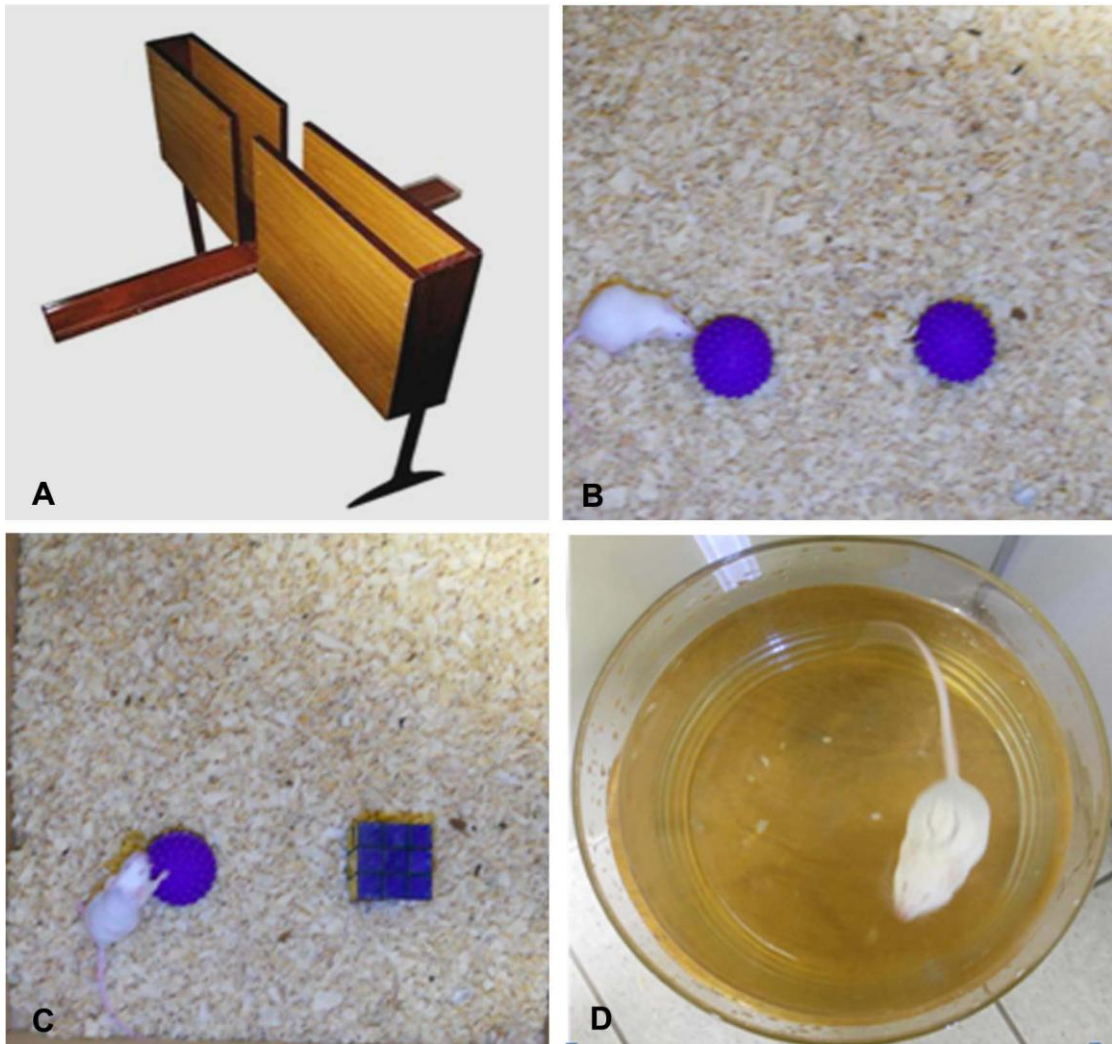


Figura 2 – Aparatos utilizados para os testes comportamentais: A - Labirinto em Cruz Elevado, B e C – Teste de Memória; D – Nado Forçado. Fonte: A – Instituto de Neurociências e Comportamento – USP (www.inec-usp.org); B, C, D - do autor.

4.3.- Estudo da Fertilidade

Com o objetivo de analisar os efeitos do danazol na fertilidade dos animais, foram investigados o tempo para o sucesso da cópula, taxa de prenhez, número de sítios de implantação totais, viáveis, em reabsorção e número de corpos lúteos.

4.3.1. Análise da taxa de implantação, viabilidade e perda embrionária

A quantificação dos corpos lúteos e dos sítios de implantação de todos os animais foi utilizada para os cálculos da taxa de implantação, taxa de viabilidade e taxa de perda embrionária.

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

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

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

Para o cálculo da porcentagem de embriões viáveis (V) utilizou-se:

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

A porcentagem de perda embrionária (P) foi calculada de acordo com fórmula:

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

4.4 Estudo morfológico, citoquímico e estereológico

Após a realização dos testes comportamentais e do estudo da fertilidade, todos os animais no 6º, 8º, 10º, 12º e 15º ddg 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, sendo encaminhados para a contagem de sítios de implantação e corpos lúteos e embebição rotineira em parafina.

4.4.1 Processamento para embebição em parafina

Os sítios de implantação embrionária coletados 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 7 μ m e estes foram montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina a 10%. Os cortes histológicos dos sítios de implantação foram submetidos à citoquímica de lectina DBA (*Dolichos Biflorus* Agglutinin).

4.4.2 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 os cortes foram submetidos à reação de citoquímica para lectina DBA da seguinte maneira:

- Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- Incubação com H₂O₂ (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- Incubação 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; (Os controles negativos foram obtidos retirando dos cortes a lectina DBA nesta etapa);
- Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com o complexo Avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:50 por 1 hora;
- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Lavagem com TBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma) 0,5 mL + TBS 0,05M pH 7,4 (4,5 mL) + H₂O₂ 30 vols. (10 μ L)

- Lavagem com água destilada;
- Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;

Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol, 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).

4.5 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.

4.5.1 Amostragem

A amostragem para análise estereológica foi constituída de 3 cortes obtidos de 3 sítios de implantação distintos, procedentes de três animais de cada grupo (controle, danazol 0,75 mg/kg, 7,5 mg/kg, 75 mg/kg) no 6^o, 8^o, 10^o, 12^o e 15^o ddg, totalizando 60 animais.

4.5.2 Estudo Estereológico

Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste ($AT=30 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) para o total de células *uNK* e para cada um dos quatro subtipos distintos de *uNK* localizados em 3 áreas (**Figura 3**) do sítio de implantação embrionária onde se distribuem estas células: Área 1: próxima ao miométrio na região mesometrial; Área 2: no endométrio entre o miométrio e o embrião implantado e; Área 3: no endométrio próximo ao embrião (PAFFARO Jr et al., 2003). A área teste foi delimitada por meio de um sistema de teste quadrático que possuía duas linhas de exclusão, sendo 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.

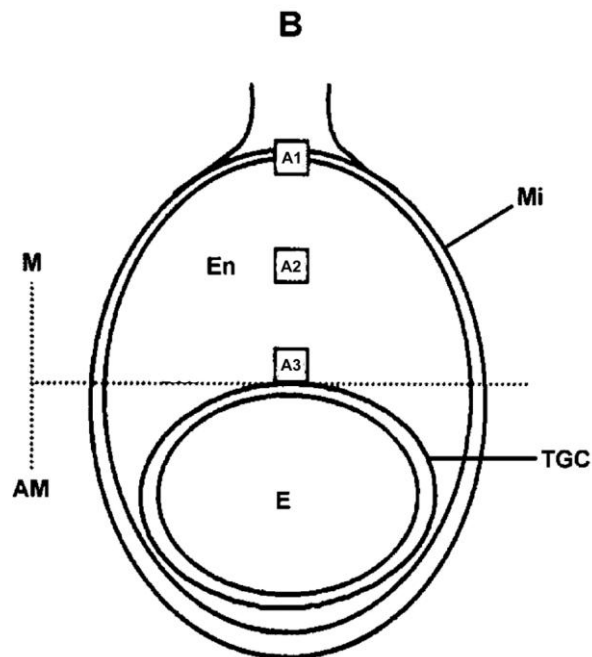


Figura 3 - Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10^o ddg e áreas 1 (A1), 2 (A2) e 3 (A3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células uNK. M - Região mesometrial; AM - região antimesometrial; Mi - Miométrio; En - Endométrio; TGC - células trofoblásticas gigantes; E - Embrião. Fonte: Modificado de Paffaro Jr et al. (2003)

4.6 Análise Estatística

O experimento foi conduzido por delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos nos testes comportamentais foram submetidos à análise não-paramétrica e teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para comparação entre os grupos. 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 e teste de Mann-Whitney-Wilcoxon. Os procedimentos foram conduzidos por auxílio do programa estatístico de domínio público BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos estudos foram executados, primeiramente, testes para análise de possíveis mudanças comportamentais em camundongos prenhes após tratamento prévio com danazol.

A ansiedade foi assim investigada utilizando como aparato o labirinto em cruz elevado, onde os parâmetros avaliados foram taxa de entrada e taxa de permanência nos braços abertos e fechados.

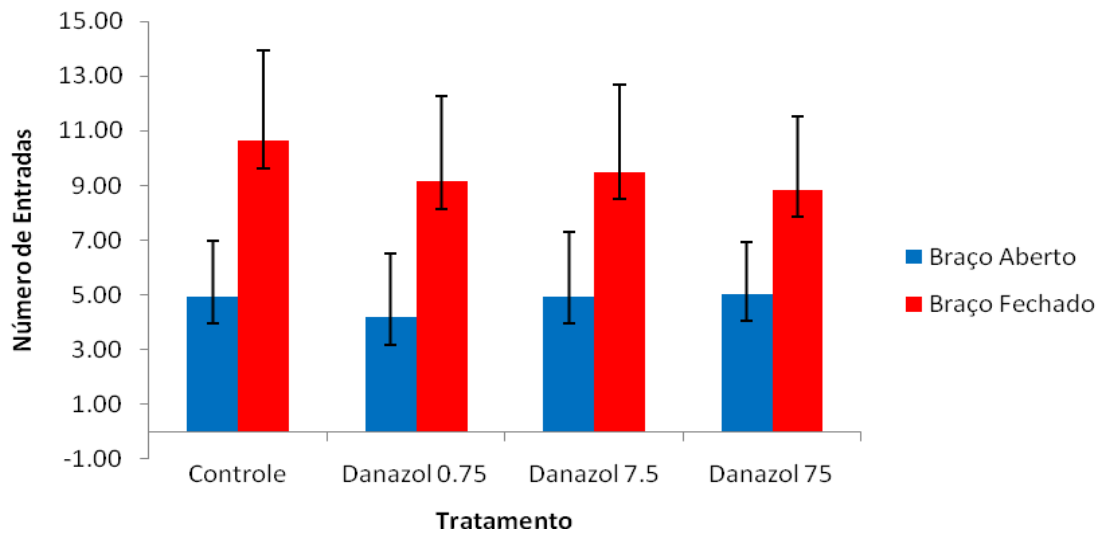


Figura 4 – Frequência de entradas nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado.

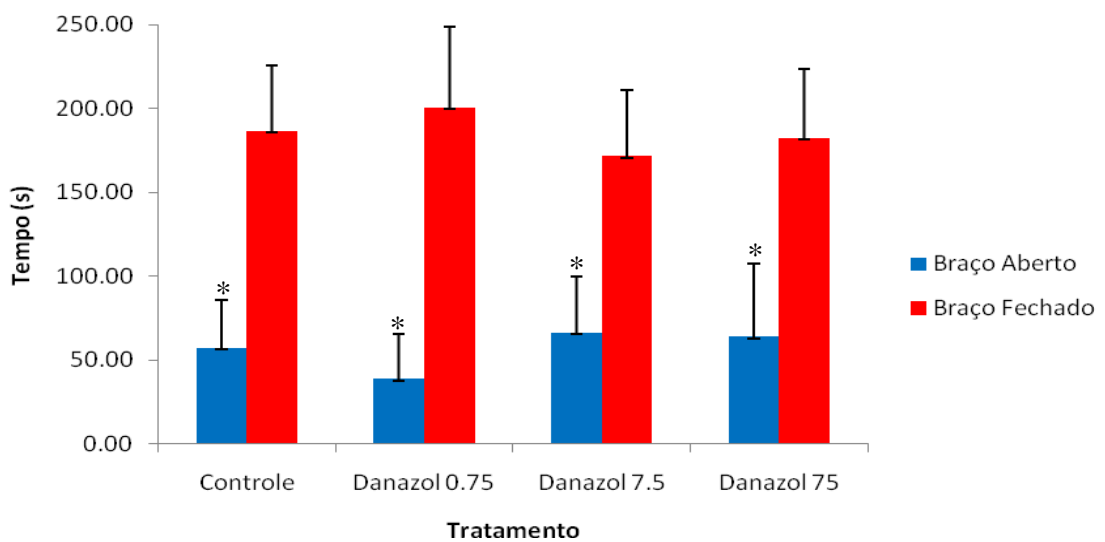


Figura 5 – Tempo de Permanência nos braços aberto e fechado do labirinto em cruz elevado.

Quando analisada a frequência de entrada nos braços abertos e fechados do labirinto em animais submetidos às diferentes concentrações de danazol foi constatado que não houve diferenças significativas entre todos os grupos analisados (**Figura 4**). No entanto, após análise do tempo de permanência nos braços abertos e fechados (**Figura 5**) foi possível constatar que a taxa de permanência nos braços abertos foi menor em animais tratados com danazol na concentração de 0,75mg/Kg ($p>0.05$) quando comparado ao controle e quando comparado com os animais tratados com as demais concentrações de danazol.

Segundo Lister (1987); File et al. (1990) e Carobrez e Bertoglio (2005) uma diminuição no tempo de permanência no braço aberto é indicativo de aumento da ansiedade nestes animais, o que sugere o efeito ansiogênico de danazol em concentração de 0,75 mg/Kg. Interessantemente a dosagem de 7,5 e 75 mg/Kg de danazol não alterou o comportamento destes animais de maneira detectável por este teste. De fato, danazol em baixas concentrações é conhecido por se ligar a receptores de progesterona bloqueando seus efeitos (MORGANTE et al., 1999). É possível, portanto, que em camundongos tratados previamente com a dosagem baixa de 0,75mg/Kg de danazol este se ligue a receptores de progesterona, bloqueando-os. Frye e Walf (2004) e Walf et al. (2006) constataram aumento da ansiedade em ratos ovariectomizados devido a diminuição de estrógeno e progesterona. Em concentrações mais altas, apesar de sua menor afinidade pelos receptores de estrógeno, danazol liga-se a estes nas células alvo, apesar da presença de esteróides endógenos (TAMAYA et al., 1984).

Quando foi procedida a análise do tempo de permanência nos braços abertos (**Figura 6**) e braços fechados (**Figura 7**) durante os dias de gestação, foi observado que danazol alterava com mais intensidade e nas três concentrações os tempos de permanência dos animais nos braços abertos. Interessantemente, no 15^o ddg foi notado que para as três concentrações os tempos de permanência nos braços fechados e abertos se aproximavam aos valores obtidos com animais controle. De fato, danazol leva apenas 24 horas para ser eliminado do organismo; no entanto, o ciclo menstrual em mulheres volta a se regularizar apenas 2 ou 3 meses após a interrupção do uso deste hormônio (PHARMACY HEALTH, 2003). Portanto, nossos resultados sugerem que por volta do 15^o ddg os efeitos de danazol no comportamento de ansiedade dos animais já foram revertidos, fazendo com que os

tempos de permanência nos braços abertos e fechados se aproximem dos tempos normais de animais controle.

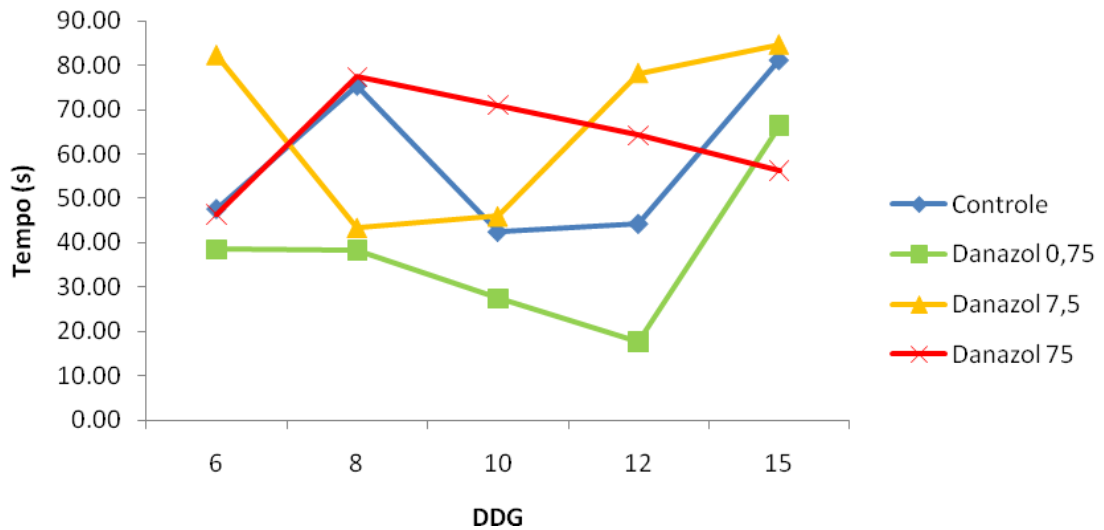


Figura 6 - Tempo de Permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado por dia de gestação

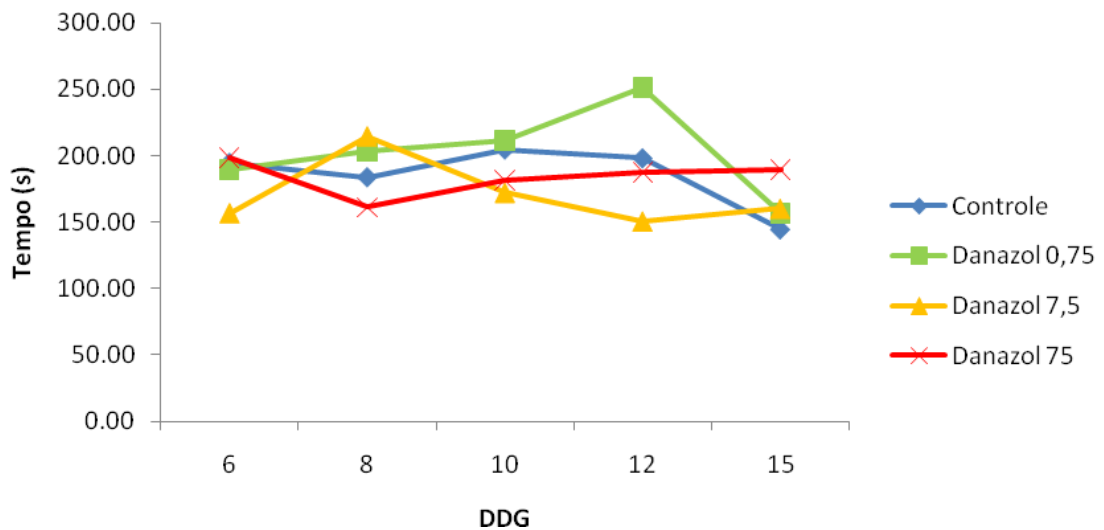


Figura 7 - Tempo de Permanência no braço fechado do labirinto em cruz elevado por dia de gestação

Após execução dos testes de reconhecimento espontâneo de objetos para verificação do possível efeito do danazol na perda de memória de curto prazo foi notado que até o 8º ddg nenhum grupo de camundongos apresentou sinais de diminuição ou aumento da capacidade de memória de curto prazo. No entanto, no 10º ddg, surpreendentemente, embora os animais controle mantivessem inalterada a

habilidade de reconhecer objetos, os animais tratados com a dosagem mais baixa de danazol apresentaram taxa de reconhecimento menor, ou seja, diminuição na capacidade de memória em relação ao controle. No entanto, no mesmo dia de gestação na dosagem de 7,5 mg/Kl a capacidade de memória de curso prazo estava aumentada significativamente em relação aos animais controle e tratados com 0,75 mg/Kl, enquanto os animais tratados com a maior dosagem eram parecidos com o controle. Interessantemente, todos os animais submetidos ao tratamento prévio com altas concentrações de danazol eram iguais aos não tratados quanto à retenção de memória (**Figura 8**). No 15^o ddg, no entanto, os animais tratados com a menor concentração de danazol (0,75mg/Kg) passaram a demonstrar melhora na capacidade da retenção de memória e aqueles tratados com 7,5 mg/Kg demonstraram diminuição na taxa de reconhecimento tornando-se ambos os grupos semelhantes aos controles neste dia de gestação.

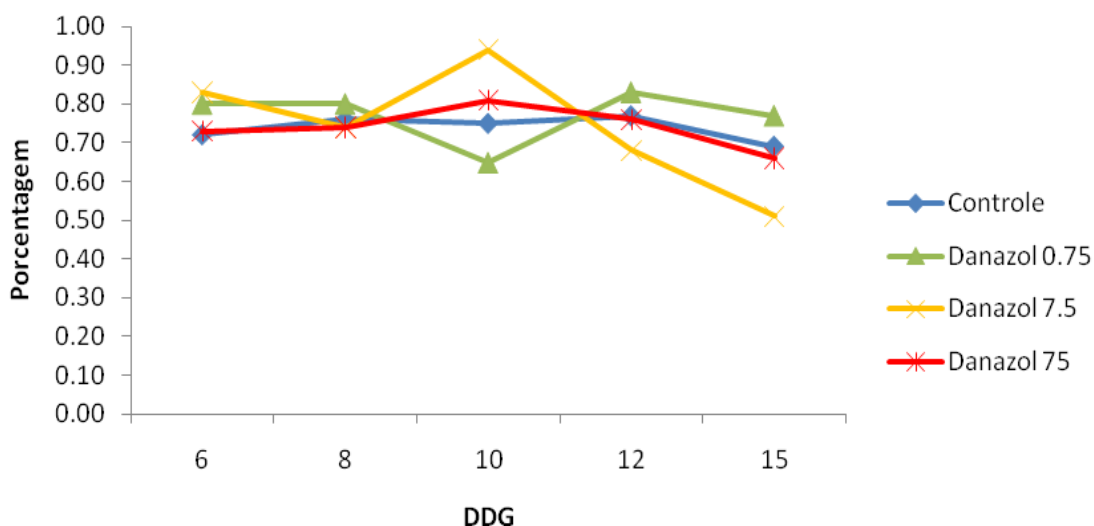


Figura 8 – Taxa de Reconhecimento em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação

Nossos resultados, portanto, indicam que o tratamento de camundongos com danazol em dosagem equivalente à terapêutica em humanos (7,5 mg/Kg) induziu melhora na memória de curto prazo no 10^o ddg, seguida por diminuição na mesma no 15^o ddg. Entretanto, o contrário foi observado com dosagem menor (0,75 mg/Kg), a qual provocou perda de memória de curto prazo no 10^o ddg e retorno para os níveis normais no 15^o ddg.

Spencer et al. (2008) em camundongos e Shang et al. (2010) em ratos, demonstraram o efeito na melhora da memória após tratamento com estrógeno. O

fato de que danazol liga-se preferencialmente em receptores de progesterona quando em dosagens baixas (MORGANTE et al., 1999) e em receptores de estrógeno, andrógenos e progesterona em dosagens mais altas (YAMASHITA et al., 1994; TAMAYA et al., 1984) sugere que em camundongos tratados com a dose de 7,5 mg/Kg, danazol exerceu efeito estrogênico o que pode ter causado um incremento na memória de curto prazo nestes animais de maneira antagônica ao observado para animais tratados com baixas taxas de danazol. Novamente, a diminuição dos efeitos de danazol após pelo menos 19 dias do término do tratamento com danazol (15^o ddg) pôde explicar o retorno das taxas de reconhecimento de objetos para números semelhantes aqueles observados em animais controle no 15^o ddg.

Acompanhando o ocorrido para as taxas de retenção de memória em animais tratados com danazol, no 10^o ddg o tempo de exploração global (A1+A2) era significativamente menor em animais submetidos às três dosagens, com valores de exploração menores à medida que a dosagem aumentava (**Figura 9**). Segundo GIUSTI-PAIVA et al. (2003) e PARRILLO et al. (1990), em seus estudos da sepsis provocada por LPS em ratos, a queda no tempo de exploração global indica um comportamento de sonolência e apatia, característico do comportamento doente. É provável que o comportamento semelhante a este seja provocado por danazol no 10^o ddg e esta ação parece ser dose-dependente.

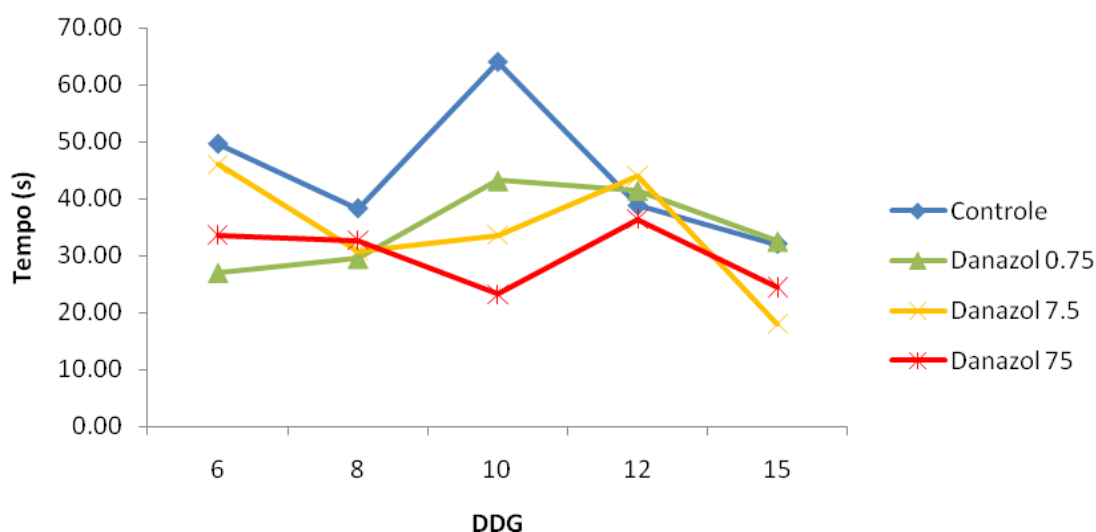


Figura 9 – Tempo de Exploração Global em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação

Os animais de cada grupo experimental foram submetidos ao teste de nado forçado para avaliar a ocorrência de possível comportamento depressivo.

Foi observado que os animais quando tratados com danazol 7,5 mg/kg permaneciam estáticos por maior período que os animais do grupo controle e demais grupos de animais tratados (**Figura 10**).

Quando analisado o efeito do danazol no comportamento de animais pelo teste do nado forçado e no decorrer da gestação (**Figura 11**), foi possível notar que o grupo tratado com danazol 7,5 mg/kg permaneceu o mesmo tempo estático que os animais dos outros grupos no 6º ddg. Entretanto, esse tempo foi maior do 8º ddg até 15º em relação aos animais tratados com dosagem mais baixa e mais alta de danazol. Interessantemente, no 10º ddg o tempo de permanência estático dos animais tratados com 7,5 mg/kg era idêntico ao do controle. De fato o comportamento depressivo é esperado quando animais são tratados com hormônios androgênicos (FOECKING et al., 2008), no entanto, surpreendentemente a dosagem que provocou comportamento equivalente a depressão de camundongos em nosso estudo foi aquela compatível com a dosagem terapêutica utilizada em humanos (KUSAKABE et al., 2007), o que corrobora e explica os achados descritos na literatura que relatam depressão em mulheres submetidas ao tratamento com danazol (DMOWSKI, 1990).

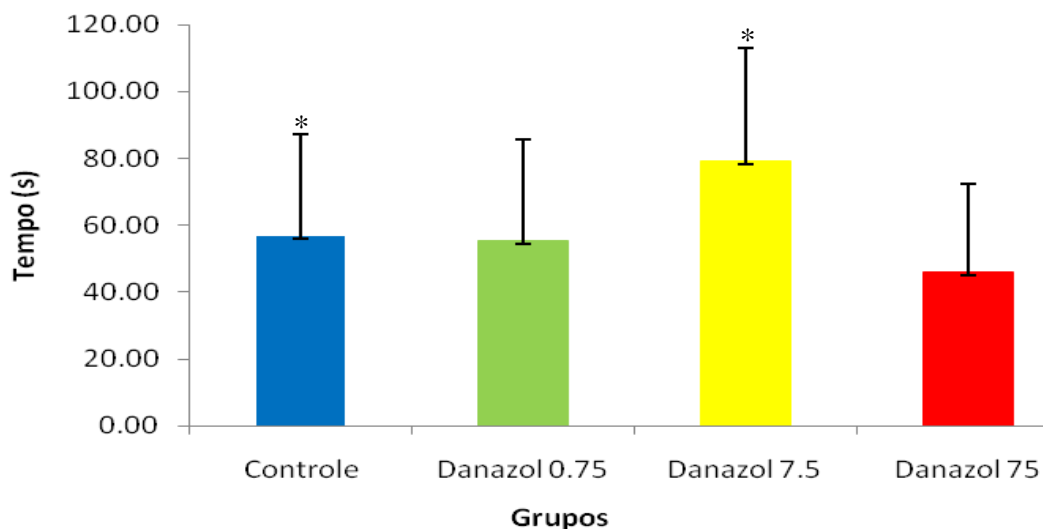


Figura 10 – Médias de tempo em que o animal permanecia estático em experimento de nado forçado nos diferentes grupos experimentais

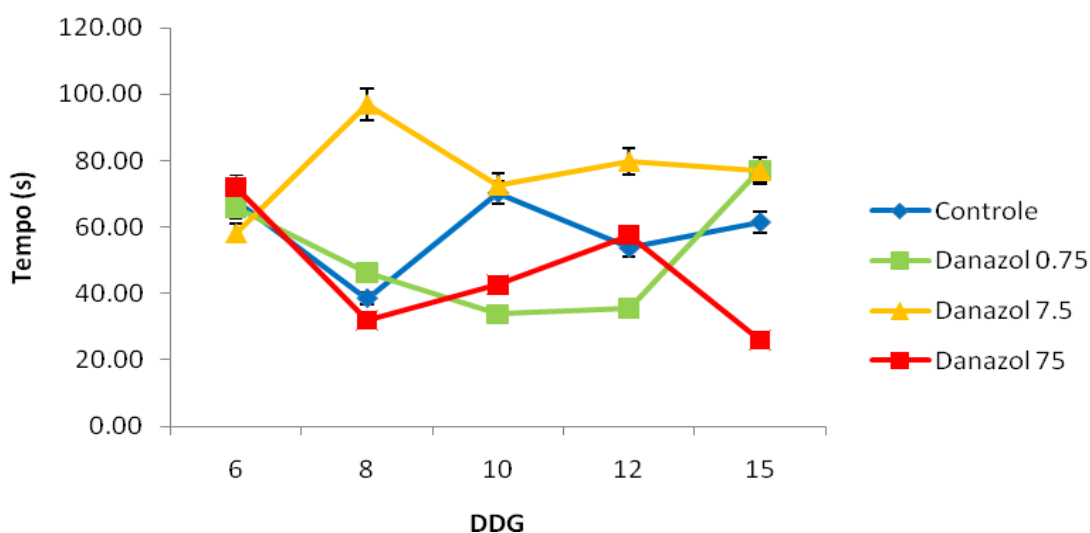


Figura11 – Médias de tempo em que o animal permanecia estático em experimento de nado forçado, nos diferentes grupos experimentais e dias de gestação

Com o objetivo de analisar os efeitos de danazol na fertilidade dos animais, foram investigados o tempo para o sucesso da cópula, taxa de prenhez, número de sítios de implantação totais, viáveis e em reabsorção e número de corpos lúteos (**Tabela 1**). Após este estudo foi possível constatar que os tratamentos com danazol nas três dosagens utilizadas em nossos estudos causavam atraso no diagnóstico da prenhez, ou seja, atraso no período para sucesso da cópula. Estes resultados estão de acordo com aqueles que revelaram que danazol atrasa o ciclo estral de camundongos por agir sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas por meio da inibição do hormônio liberador de gonadotrofinas (FRANCHIMONT e CRAMILION, 1977); e também concordam com os resultados de Kusakabe et al., 2007, que revelaram atraso no tempo para sucesso da prenhez após tratamento com este hormônio. Interessantemente, mesmo atrasando o tempo para sucesso da cópula, danazol foi capaz de aumentar a taxa de prenhez de camundongos até com dosagens baixas, o que demonstra a eficiência do tratamento prévio com esta droga na melhora das condições uterinas.

Entretanto, quando analisado o número médio de sítios de implantação, foi observado um número significativamente menor destes sítios em animais tratados com a menor dosagem (0,75 mg/Kg), e maior, em animais tratados com a dosagem equivalente a terapêutica (7,5 mg/Kg). Quanto aos sítios de implantação diagnosticados como viáveis, o número destes sítios também foi menor com a dosagem 0,75 mg/Kg e maiores com a dosagem terapêutica. No entanto, não foram

diagnosticadas diferenças significativas entre os números de sítios de implantação diagnosticados macroscopicamente como sítios em reabsorção e entre os números de corpos lúteos. Estes resultados demonstraram que danazol é capaz de aumentar a taxa de prenhez e o número de sítios de implantação na dosagem conhecida como terapêutica, sem contudo, em nenhuma das dosagens interferir na função ovariana e causar aumento na reabsorção embrionária em camundongos. De fato, a ação dose dependente de danazol já foi descrita na literatura (OLSSON, 1986; MORGANTE et al., 1999) e em camundongos a dosagem de 7,5mg/Kg foi apontada por Kusakabe et al. (2007) como aquela ideal para gentilmente mudar as condições do útero sem causar alterações deletérias durante a gestação.

	Controle	Danazol		
		0,75 mg/kg	7,5 mg/kg	75 mg/kg
PSC (dias)	3.8 ± 1.33 *	5.62 ± 2.69 *	5.05 ± 2.28 *	6.86 ± 3.81 *
TP (%)	76.6 (30)	91.6 (24)	86.2 (29)	86.2 (29)
SI	10,4 ± 2,6	8,5 ± 4,0 *	11,3 ± 2,8 *	10,1 ± 3,5
SV	9,6 ± 2,6	7,9 ± 3,7 *	10,6 ± 3,0 *	9,5 ± 3,4
SR	0,8 ± 1,5	0,5 ± 1,3	0,7 ± 1,5	0,6 ± 1,1
CL	12,5 ± 2,5	11,9 ± 2,7	13,6 ± 3,3	12,5 ± 2,3

Tabela 1 - Estudo da fertilidade. PSC. Período para sucesso da cópula, TP. Taxa de prenhez. SI. Número de sítios de implantação. SV. Número de sítios de implantação viáveis. SR. Número de sítios em reabsorção, CL. Número de corpos lúteos. Controle (água + tween).

Quando observados macroscopicamente, os cornos uterinos dos animais tratados com danazol não apresentavam sinais de hemorragia no interior dos sítios de implantação em nenhum dos grupos analisados em nossos estudos e os sítios em reabsorção eram raros (Figura 12). Foram constatados sinais equivalentes à hemorragia apenas entre os sítios de implantação de animais tratados, mas estes foram, concomitantemente, observados em cornos uterinos de animais controle. Foi possível observar macroscopicamente, em todos os dias de gestação, uma diminuição no número de sítios de implantação em cornos uterinos de camundongos tratados com a dosagem de 0,75 mg/Kg (**Figura 12 b, f, j**) e um maior número destes sítios em animais tratados com 7,5 mg/Kg (**Figura 12 c, g, k**) em relação aos animais do grupo controle (**Figuras 10 a, e, i**). A dosagem de 75 mg/kg não

provocou alterações nos sítios de implantação diagnosticáveis macroscopicamente (Figura 12 d, h, l).

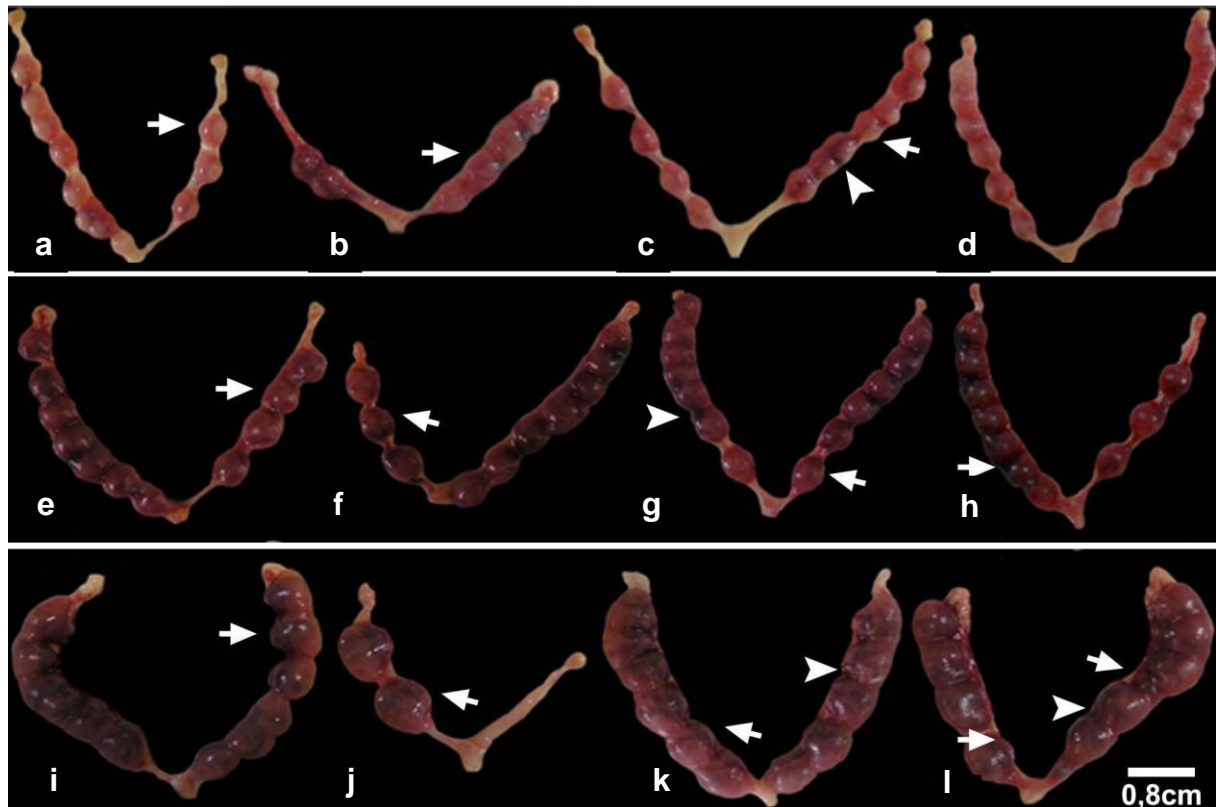


Figura 12 - Imagens macroscópicas de úteros de camundongos no 10^o (a, b, c, d), 12^o(e, f, g, h) e 15^o ddg (i, j, k, l). Sítios de implantação do grupo controle (a, e, i) - Sítios com aspecto normal (setas) , sem sinais de hemorragia no interior dos sítios ou comprometimento da viabilidade dos embriões. Grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg (b, f, j) - Notar sítios de implantação em menor quantidade (setas). Grupo tratado com danazol 7,5 mg/kg (c, g, k) - Sítios com aspecto normal (setas), com poucos sinais de hemorragia entre os sítios (cabeças de seta) semelhante ao encontrado nos controles. Grupo tratado com danazol 75 mg/kg (d, h, l). Notar apenas um sítio diagnosticado como sítios em reabsorção (seta) e sinais de hemorragia entre os sítios (cabeças de seta) equivalentes às dosagens de 0,75, 7,5 e controle.

Os números obtidos durante a contagem dos sítios de implantação totais, viáveis, em reabsorção e dos corpos lúteos, foram utilizados para o cálculo das taxas de implantação, viabilidade e perda embrionária durante a gestação de camundongos.

Quando estudados os parâmetros para cálculo da taxa de implantação embrionária foi possível constatar uma diminuição significativa no número de implantações embrionárias no grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg quando comparado ao controle (Figura 13) o que concorda com nossos resultados obtidos na observação macroscópica dos cornos uterinos destes camundongos (Figura 12).

Em todos os demais grupos estudados não foram encontradas diferenças significativas na taxa de implantação.

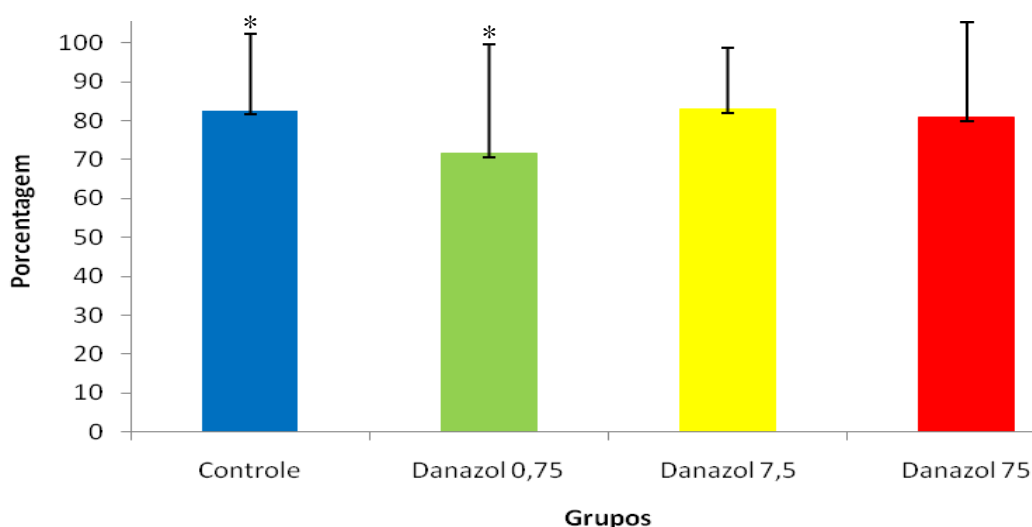


Figura 13 – Média das taxas de implantação total em todos os grupos experimentais.
* Diferença significativa $p < 0,05$.

Além disso, quando avaliada a taxa de viabilidade embrionária foi possível notar que existia um número menor de embriões viáveis no grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg quando comparado aos animais controle (**Figura 14, Tabela 1**).

Quando analisada a taxa de perda embrionária, foi possível constatar uma diminuição nesta taxa em animais tratados com 0,75 e 7,5 mg/Kg apenas no 15º ddg (**Figura 15**). Interessantemente, do 6º ao 12º dg não foi observado alterações na perda embrionária com nenhum tratamento de danazol. É importante salientar que a taxa de perda embrionária é obtida por meio da contagem de sítios de implantação em reabsorção e dos corpos lúteos, ou seja, nossos resultados demonstram que apenas no 12º ddg os sítios em reabsorção puderam ser claramente observados tanto nos animais controle quanto nos animais tratados com danazol. Portanto, os dados obtidos durante a análise da perda embrionária em nossos estudos, indicam que o tratamento com danazol nas concentrações mais baixas diminuiu a perda fetal fato este diagnosticado apenas após a placentação, ou seja, no 15º ddg.

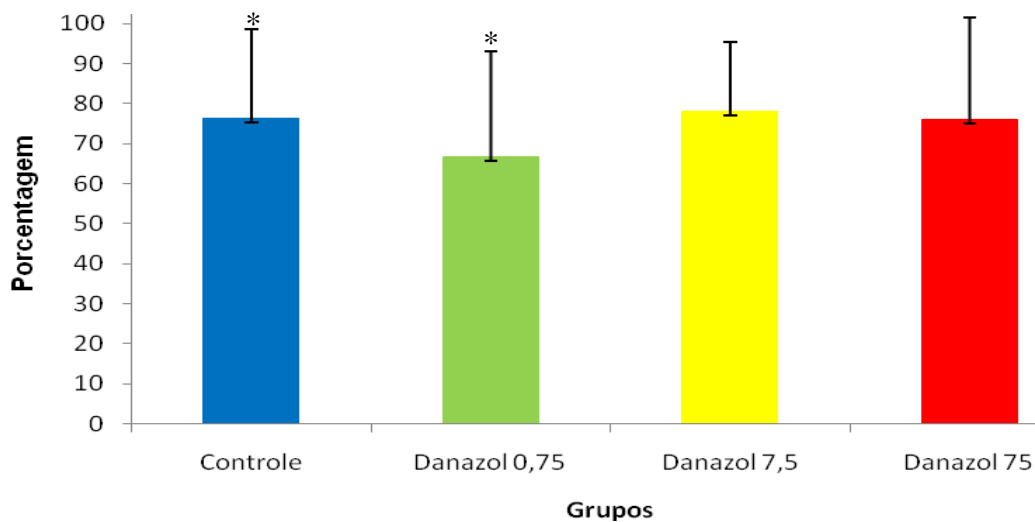


Figura 14 – Média das taxas de viabilidade embrionária em todos os grupos experimentais.
* Diferença significativa $p < 0,05$.

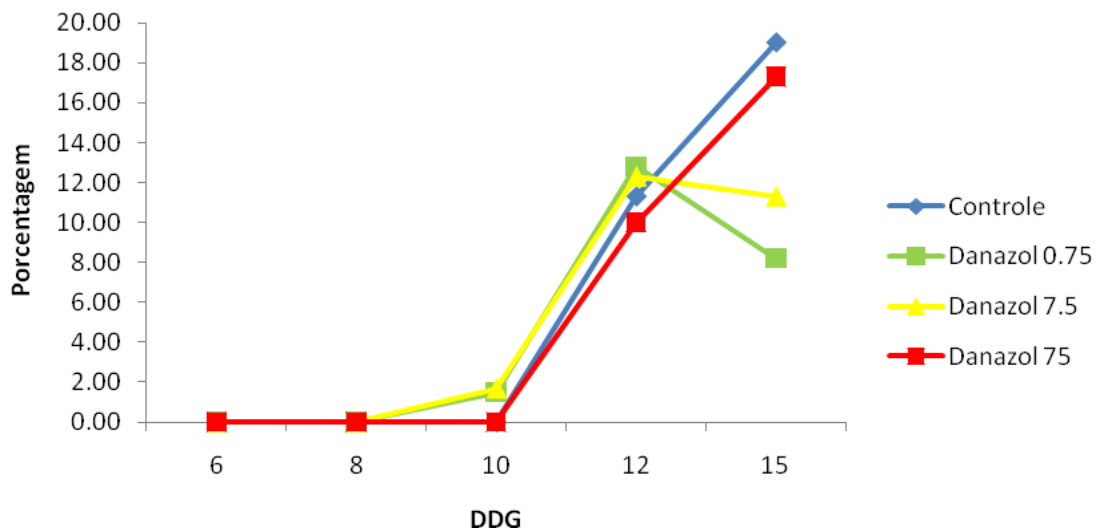


Figura 15 – Média das taxas de perda embrionária nos grupos experimentais em todos os dias de gestação analisados.
* Diferença significativa $p < 0,05$.

As taxas de implantação e viabilidade embrionária para os grupos tratados com danazol 7,5 mg/Kg apresentaram-se estatisticamente iguais às obtidas para o grupo controle. Os resultados obtidos com o tratamento de 7,5 mg/Kg de danazol corroboram aqueles apresentados por Kusakabe et al. (2007) que consideraram a dose de 7,5 mg/kg de danazol apropriada por alterar suavemente as condições internas do útero, através de efeitos hormonais. Segundo estes autores, a dose de 7,5 mg/kg de danazol também mostrou uma melhora na gravidez, além de apresentar efeitos colaterais menores quando comparados às doses mais altas.

A diminuição significativa nas taxas de implantação e viabilidade nos grupos tratados com a menor dose de danazol sugere sua ação direta na janela de implantação embrionária. Portanto, apesar desse hormônio ser utilizado para o tratamento da endometriose em mulheres, sua ação dose-dependente sobre a janela de implantação deve ser considerada quando se objetiva o aumento da fertilidade.

Em nossos estudos foram também realizadas análises sob o microscópio de luz de cortes histológicos submetidos à citoquímica de lectina DBA de sítios de implantação embrionária dos camundongos normais e tratados com danazol. Nestes espécimes, incluindo os de animais tratados, foi possível identificar os 4 subtipos das células natural killer uterinas caracterizados por Paffaro Jr et al. (2003) (**Figura 16**).

Sendo assim, o subtipo 1 das células natural killer uterinas apresentava aspecto linfóide, sendo pequena em diâmetro, sem grânulos citoplasmáticos e com núcleo contendo predominantemente heterocromatina (**Figura 16A**). O subtipo 2 dessas células apresentava diâmetro maior do que a anterior e possuía grânulos citoplasmáticos (**Figura 16B**). O subtipo 3 era muito maior em diâmetro, apresentava muitos grânulos citoplasmáticos e núcleo predominantemente com eucromatina (**Figura 16C**). E finalmente o subtipo 4 representava o estágio de senescência dessas células com conteúdo granular variável e grandes regiões lembrando extração citoplasmática (**Figura 16D**). Não foram observadas alterações no padrão de reatividade da lectina DBA para estas células, nem tão pouco alterações em seus grânulos e superfície. Estudos recentes demonstraram que em certas situações as células uNK podem ter seu padrão de reatividade para lectina DBA modificado em resposta a uma situação de estresse como a infecção por LPS (ZAVAN, 2011, LIPPE, 2007) e por lesão mecânica intrauterina do embrião (ROMAN, 2001 e LIPPE, 2007) Tais alterações foram descritas como sugestivas da ativação da atividade citotóxica destas células. No entanto, o tratamento com danazol não causou estas alterações o que sugere fortemente que este hormônio sintético não atua direta ou indiretamente em células natural killer uterinas para ativar sua citotoxicidade.

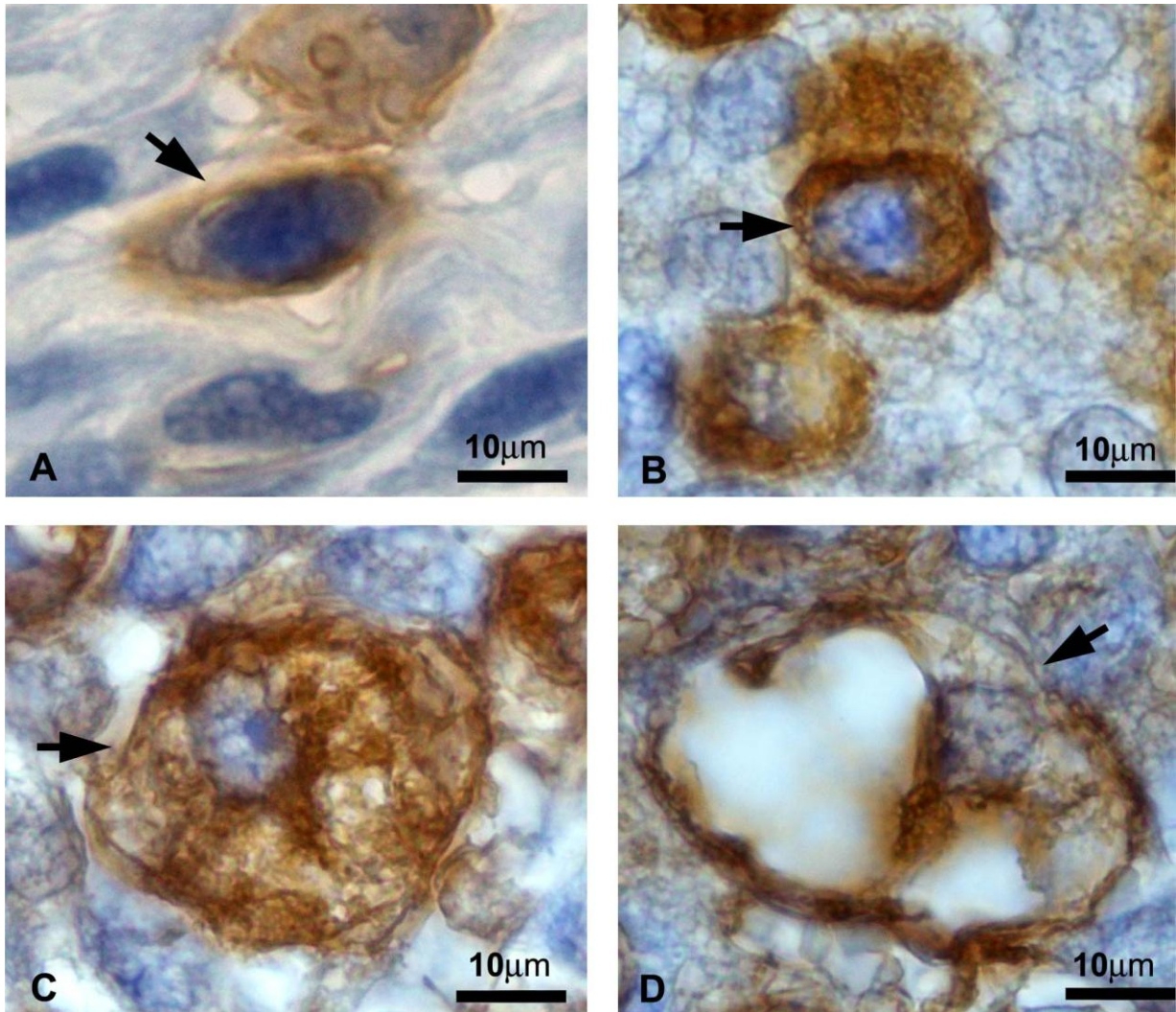


Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10^o ddg. Notar as células imaturas do subtipo 1 (A) e subtipo 2 (B) e aquelas diferenciadas pertencentes ao subtipo 3 (C) e senescentes do subtipo 4 (D). Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Foi procedida a análise morfológica dos sítios de implantação do 6^o ao 15^o ddg. Durante este estudo morfológico foi possível observar que comparado com animais normais (**Figura 17A**), os sítios de implantação de camundongos no 6^o ddg tratados com a menor (**Figura 17B**) e maior (**Figura 17D**) dosagem de danazol eram menores. No entanto, a camada do miométrio nestes animais tratados era aparentemente maior quando comparada ao controle. Por meio da análise detalhada dos sítios de implantação de animais tratados com 0,75 de danazol foi observado que a decídua parecia menos desenvolvida que em animais controle e não foram encontradas células uNK DBA reativas nestes animais. Os sítios de implantação que mais se assemelhavam aos controles tanto no tamanho, espessura do miométrio, quanto na decidualização foram aqueles provenientes de animais tratados com a

dose de 7,5 mg/Kg (**Figura 17C**). Tanto em animais tratados com 7,5 mg/Kg quanto aqueles tratados com 75 mg/Kg foram encontradas células uNK DBA reativas.

De acordo com Abrahamsohn e Zorn (1993), a decidualização é um fenômeno que começa imediatamente após a implantação do blastocisto, o qual ocorre em camundongos por volta do 5º ddg. Este fenômeno envolve a diferenciação de células do tipo fibroblasto uterinas em células epitelióides que formam um novo tecido no útero durante a prenhez e que recebeu o nome de decídua. Estas células começam a exibir nucléolo evidente (LUNDKVISK, 1978), hipertrofiam, formam junções citoplasmáticas umas com as outras e uma grande redução do conteúdo de matriz extracelular é notada ao redor destas células (ABRAHAMSOHN e ZORN, 1993). A decídua é muito importante durante a gestação, sendo que ela permite a instalação segura do blastocisto no endométrio (De FEO, 1967; FINN, 1977; ABRAHAMSOHN, 1983), nutre o embrião nos estágios (BILLINGTON, 1971; KATZ, 1995) e controla a invasividade das células trofoblásticas gigantes (KIRBY e COWELL, 1968; FINN 1971).

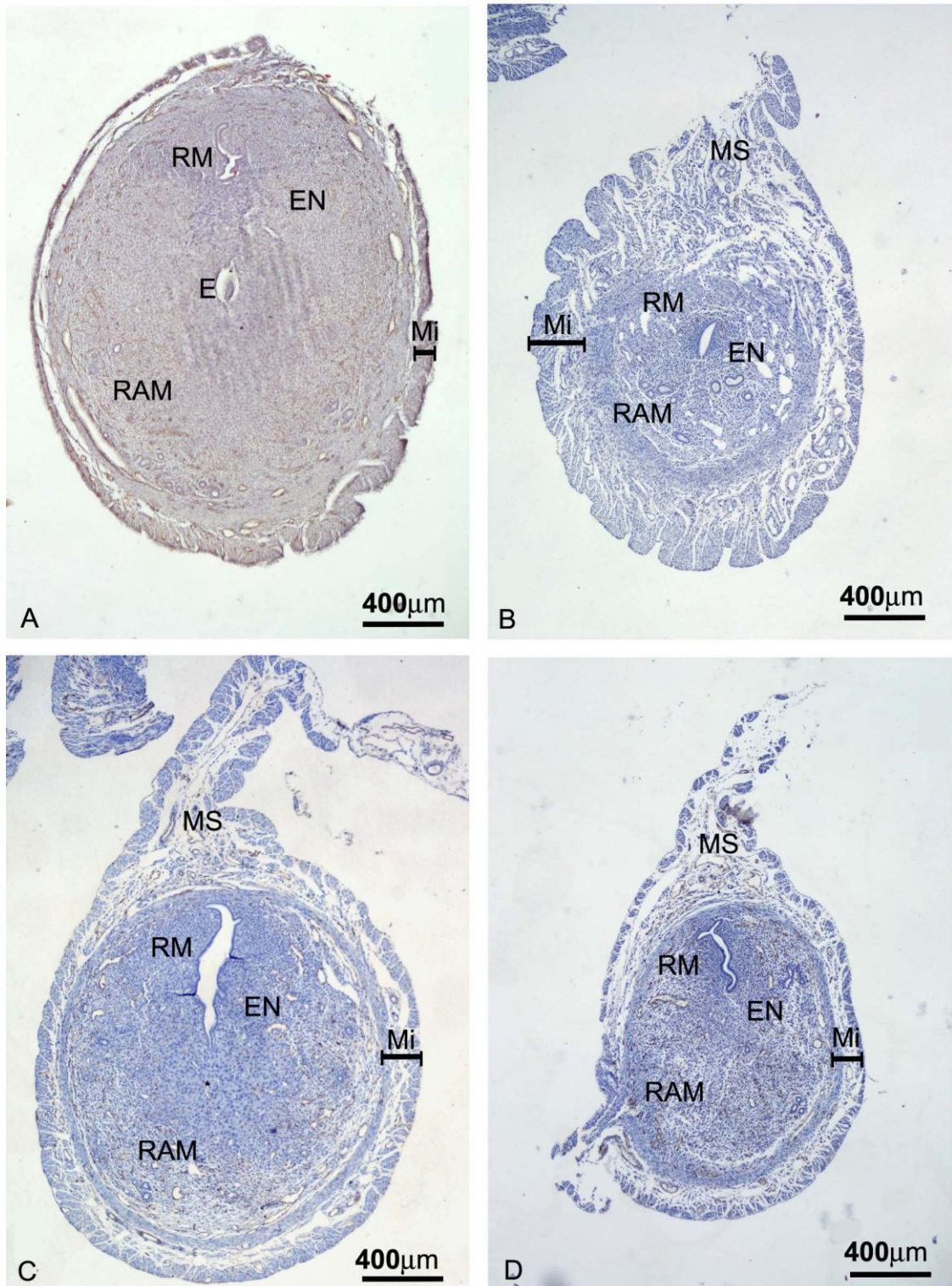


Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 6^o ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/Kg e com tamanho menor (B) e miométrio mais espesso (Mi). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg de aspecto normal (C). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg de tamanho menor (D). Embrião (E). Mesométrio (MS). Região Mesometrial (RM). Região antimesometrial (RAM). Endométrio (EN) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

No 8º ddg, por sua vez, foram notadas células uNK DBA reativas em todos os animais analisados, controles e tratados (Figura 18A-18D). Os sítios de implantação dos animais tratados com 0,75 (Figura 18B) continuavam parecendo menores que os de animais controle, porém a camada do miométrio tinha aspecto normal em todos os animais tratados e não foram notados indícios de atraso na decidualização nos camundongos neste dia de gestação.

Quando comparados aos sítios de implantação de camundongos controle (**Figura 19A**), ao contrário dos sítios de animais tratados no 6º e 8º ddg, os sítios de implantação de animais tratados no 10º ddg não pareciam menores (**Figura 19B e C**). Sob o microscópio de luz, estes sítios possuíam inúmeras células uNK a semelhança do que foi observado para animais controle no mesmo dia de gestação. No entanto, após análise detalhada e em maior aumento destes sítios de implantação, foram observadas células grandes e de citoplasma basófilo com inúmeros prolongamentos ao redor de vasos sanguíneos (**Figura 19D**). Estas células se assemelhavam às células trofoblásticas gigantes, no entanto, não foram utilizados marcadores em nossos estudos que comprovassem a identidade destas células. Estas grandes células nos animais tratados formavam cordões muito espessos nestes vasos, fazendo com que o diâmetro destes se tornasse aparentemente maior que os descritos em camundongos normais (CROY et al., 2003^a e CROY et al., 2003^b) (**Figura 19E**). A partir do 10º ddg, em todos os animais tratados e controles, foram notados sob a microscopia de luz alguns sítios de implantação com embriões em reabsorção em sítios que demonstravam moderada hemorragia (**Figura 19F**). A frequência na qual estes sítios em reabsorção eram observados em microscopia de luz era equivalente à frequência dos mesmos sob análise macroscópica (**Tabela 1**).

No 12º e 15º ddg em animais tratados com danazol os sítios de implantação continuavam a apresentar tamanhos (**Figura 20B**) equivalentes ao controle (**Figura 20A**). No entanto, surpreendentemente, a partir do 12º ddg foi notado um aparente atraso na placentação em animais tratados com danazol na concentração de 7,5. Os cortes histológicos das placentas destes animais tinham traves de células placentárias espessas e indiferenciadas semelhantes às encontradas em animais no 11º ddg (**Figura 20C**). Esta desorganização do espongiotrofoblasto e labirintotrofoblasto em animais tratados com danazol 7,5 mg/Kg e a partir do 12º ddg e a ocorrência de grandes áreas contendo células

indiferenciadas em meio ao labirinto trofoblasto nestes animais, não concordavam com a morfologia da placenta normal de camundongos descrita na literatura (PEEL e BULMER, 1977; MUNTENER e HSY, 1977; GEORGIADES et al., 2001).

Além disso, nos animais tratados com danazol 7,5 mg/Kg no 12º e 15º dias de gestação, continuaram sendo observadas grandes células semelhantes às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos (**Figura 20D e E**). A ocorrência destas células em animais nestes dias de gestação sugere que danazol, nesta concentração, é capaz de aumentar a invasividade das células trofoblásticas gigantes que são descritas como células que têm por função invadir o endométrio conseguindo espaço para o crescimento do embrião por meio de sua alta invasividade e nutrição do embrião por meio de seu potencial fagocítico (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010; AMARANTE-PAFFARO et al., 2010).

No 12º e 15º dias de gestação continuaram sendo observados alguns embriões em reabsorção em frequências equivalentes às obtidas pela análise macroscópica (**Tabela 1**). De fato, danazol parece não aumentar, em nenhuma concentração, a perda embrionária, fato este evidenciado pela análise macroscópica, microscópica e das taxas de perda embrionária.

No entanto, como referido anteriormente, de acordo com estudos de Morgante et al. (1999) baixas doses de danazol fazem com que o mesmo não se ligue aos receptores de estrógeno, mas sim provocam a ligação estável desse hormônio aos receptores para andrógenos e progesterona. A ligação aos receptores de progesterona, característico da farmacologia do danazol em dosagens baixas, pode aumentar a ansiedade (diagnosticado pelo labirinto em cruz elevado), diminuir a capacidade de retenção de memória (teste de reconhecimento espontâneo de objetos), agir diminuindo a implantação embrionária e a viabilidade fetal. Esta ligação pode explicar também o atraso na decidualização observado neste grupo, já que o processo de decidualização é induzido em grande parte pela progesterona (FRANCO et al., 2011).

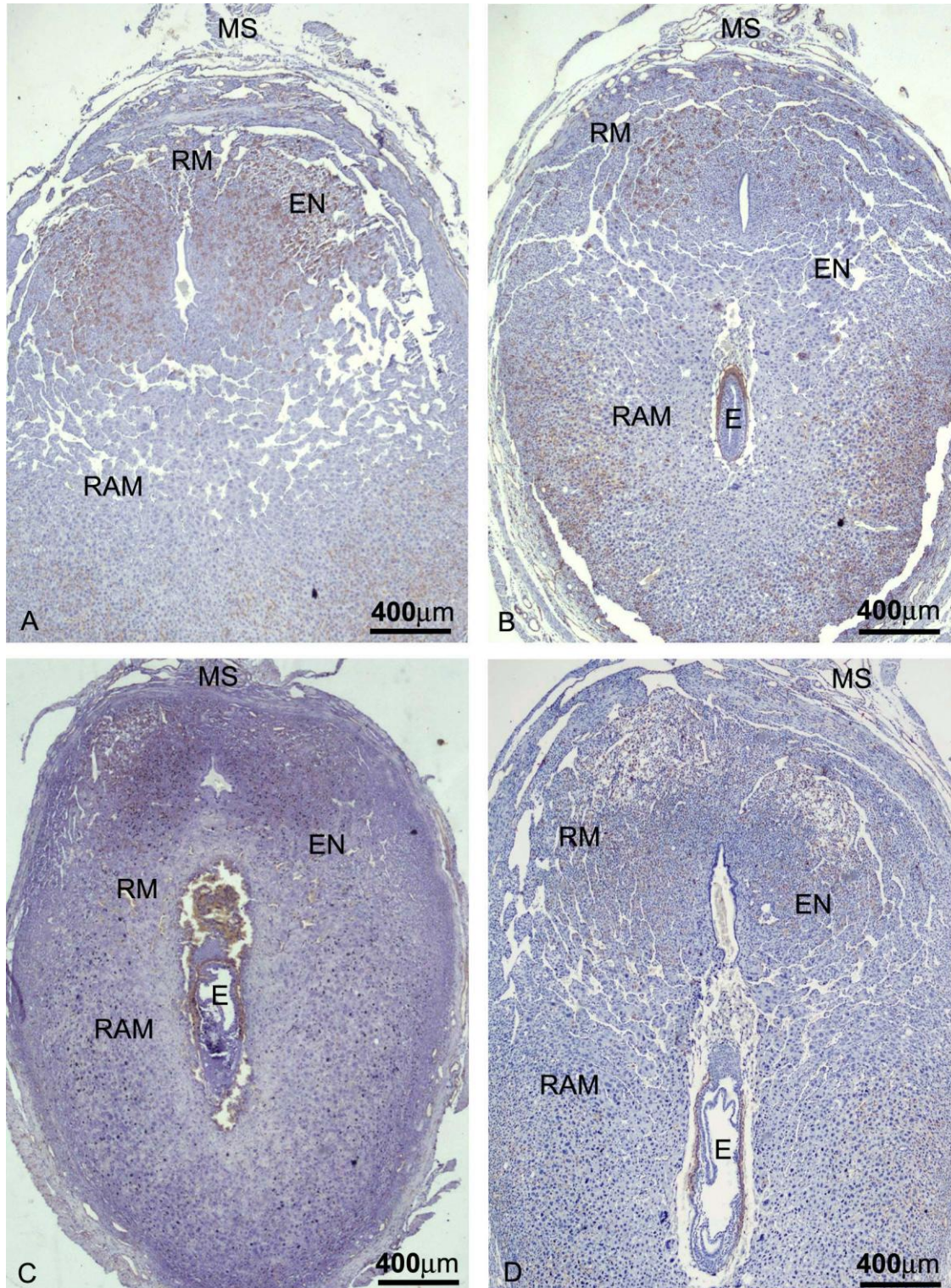


Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 8º ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/Kg e com tamanho menor (B). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg com embrião aparentemente maior (C) em relação ao tratado com 0,75 e controle. Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg com embrião (E) maior que o encontrado no restante dos animais (D). Embrião (E). Mesométrio (MS). Região Mesometrial (RM). Região anti-mesometrial (RAM). Endométrio (EN) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

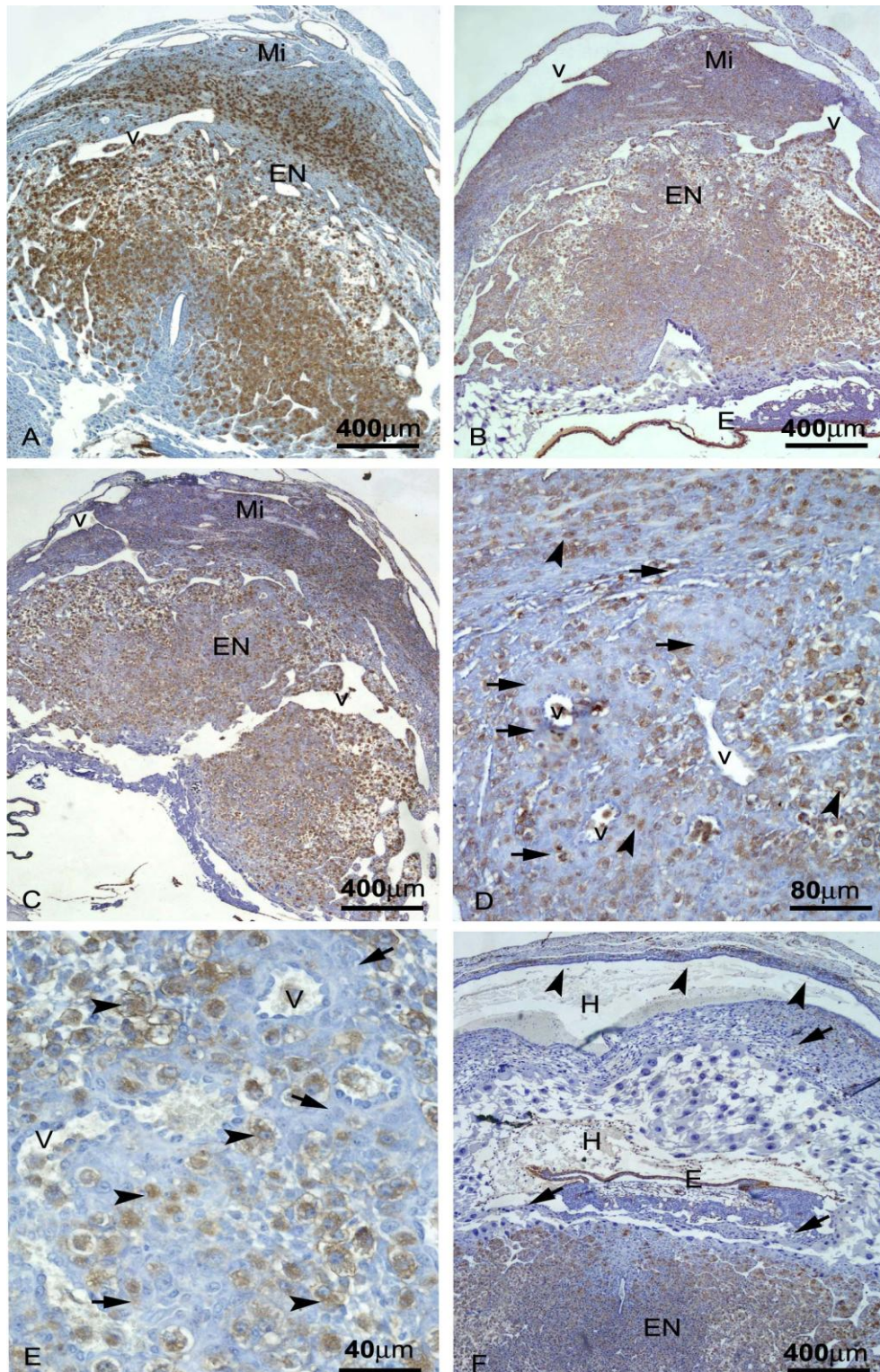


Figura 19 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 10º ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/kg com aparência normal (B). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg com muitas células semelhantes às células trofoblásticas ao redor de vasos (C). Detalhe de C com células semelhantes às trofoblásticas formando cordões espessos ao redor dos vasos (D) (setas) e células uNK (cabeças de seta). Detalhe de D. Células tipo trofoblasto (setas) e células uNK (cabeças de seta) (E). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg (E) com embrião morto (F) em sinais de intensa hemorragia (H). Embrião (E). Mesométrio (MS). Endométrio (EN) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

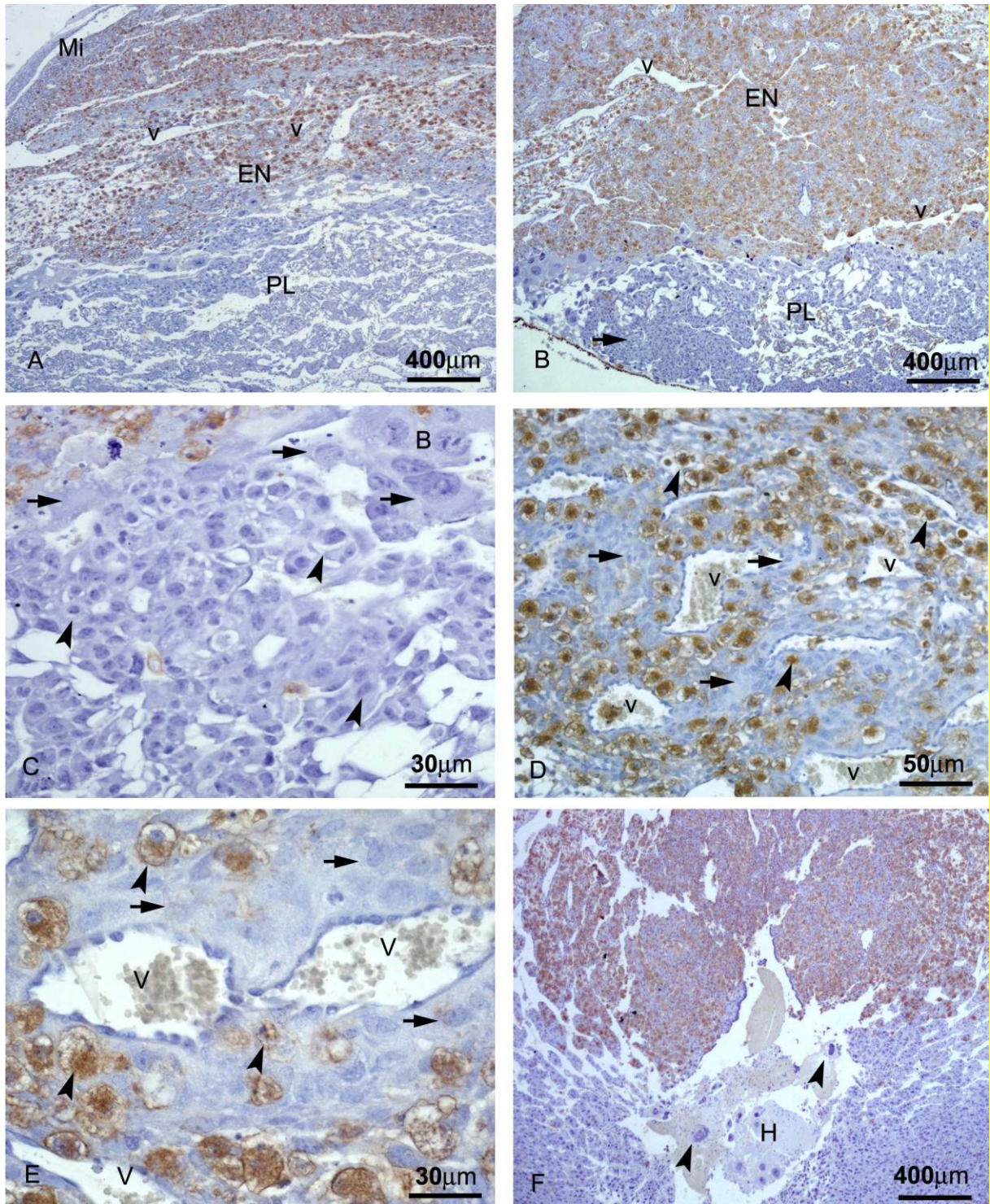


Figura 20 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 12^o ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/kg onde a placenta parecia pequena e com ilhas de células trofoblásticas indiferenciadas (seta) (B). Detalhe de B mostrando células indiferenciadas onde já deveria existir labirintotrofoblasto (C). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg com muitas células semelhantes às células trofoblásticas (setas) ao redor de vasos (D) e células uNK (cabeças de seta). Detalhe de D com células semelhantes às trofoblásticas formando cordões espessos ao redor dos vasos (E) (setas) e células uNK (cabeças de seta). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg (F) com embrião morto (E) em sinais de intensa hemorragia (H). Embrião (E). Miométrio (Mi). Endométrio (EN) Placenta (PL). Vaso (v) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Durante a avaliação da influência das diferentes concentrações de danazol sobre o número total de células uNK reativos à lectina DBA, foi observado que o número de células uNK era menor que o encontrado em animais controle até o 8º ddg nos animais tratados com 0,75 e 7,5 mg/Kg de danazol (**Figura 21**). Até este dia de gestação, nos animais tratados com 75 mg/Kg de danazol, o número de uNK era idêntico ao de animais controle. A partir do 10º ddg, no entanto, foi observado um aumento significativo no número de células uNK em animais tratados com 7,5 mg/Kg, enquanto em animais tratados com 0,75 mg/Kg estas células continuavam menores em número e nos tratados com 75 mg/Kg o número de uNK diminuiu expressivamente. No 12º ddg a quantidade total de células uNK se manteve inalterada nos animais de todos os grupos, contudo, no 15º ddg o número destas células passou a ser igual estatisticamente.

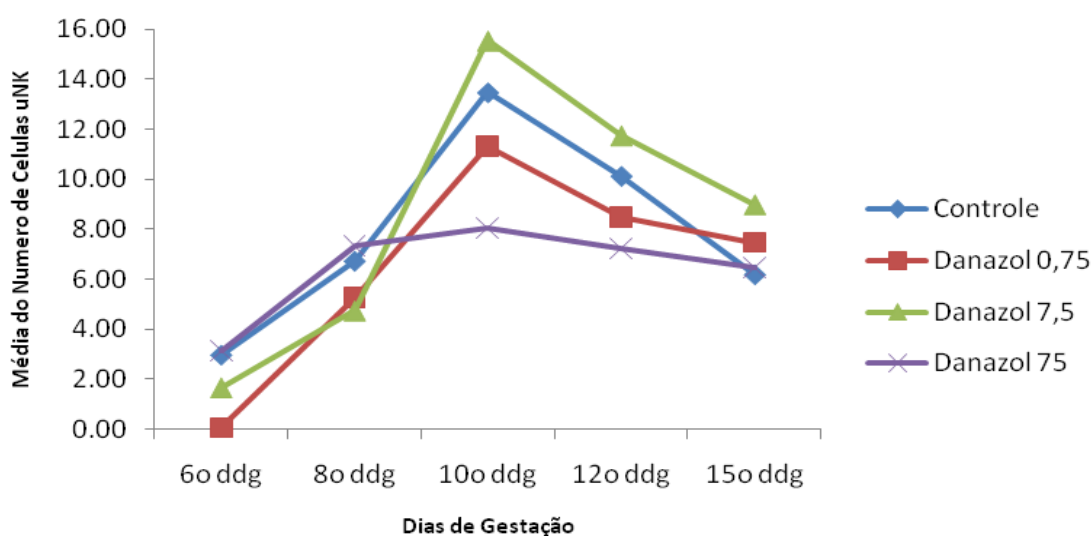


Figura 21 - Representação gráfica da média total de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações

Durante nosso estudo quantitativo dos subtipos de células uNK uterinas DBA reativos em três áreas do útero prenhe de camundongos foi observado que na área 1, mais distante do embrião implantado, as células uNK do subtipo 1, 2, 3 e 4 eram raras em animais tratados com 0,75 mg/Kg de danazol (**Figura 22**). No entanto, no 10º ddg, nestes animais, o número de uNK do subtipo 1 era significativamente maior em relação ao controle nesta área, ao passo que aquelas do subtipo 3 e 4 eram menores em número. No 12º e 15º ddg as uNK do subtipo 4 eram significativamente menores e maiores em número respectivamente e em relação aos animais controle. Na mesma área, entretanto, nos sítios de implantação de

camundongos tratados com a dosagem de 75 mg/Kg foi observada alteração significativa apenas no número de uNK do subtipo 1 no 10º ddg, onde estas se encontravam em maior número e em células do subtipo 4 no 15º ddg, onde foram encontradas em maior número em relação aos animais controle. No que diz respeito aos animais tratados com a concentração de 75 mg/Kg, estes apresentaram também maior número de células uNK do subtipo 1 e menores números daquelas do subtipo 3 no 10º dgg. As unk do subtipo 4 eram maiores em numero no 15º ddg em relação aos controles. Estudos caracterizaram a área 1 como a área de chegada de células uNK uterinas, fenômeno que ocorreria por volta do 5º ddg em camundongos (PAFFARO Jr et al., 2003). O aumento em número de células uNK do subtipo 1 nesta área no 10º ddg em todos os grupos de camundongos tratados com danazol, sugere que o tratamento prévio com este esteróide sintético aumenta a migração de células uNK para o útero durante a gestação.

Na área 2 (**Figura 23**), as células uNK pertencentes ao subtipo 1, 2, 3 e 4 continuaram raras em animais tratados com 0,75 mg/Kg de danazol no 6º ddg. Redução significativa foi observada neste grupo de animais no número de células uNK do subtipo 4 no 8º ddg e 10º ddg. Adicionalmente, um número menor de células uNK do subtipo 3 foi observado no 12º ddg. Não foram encontradas diferenças significativas nos números dos diferentes subtipos de unk no 15º ddg em animais deste grupo na área 2. No que diz respeito aos animais tratados com a dosagem de 7,5 mg/Kg de danazol, foi observado uma redução no número das células uNK do subtipo 3 apenas no 12º ddg. Esta redução foi concomitante a um aumento no número de células uNK do subtipo 4 no 12º e 15º ddg nestes animais. Quanto aos animais tratados com 75 mg/Kg, estes apresentavam grandes alterações no número dos subtipos de células uNK nesta área, sendo o subtipo 1 maior em número no 6º e 8º ddg, enquanto o subtipo 3 estava em menor número no 8º e 10º ddg e o subtipo 4 de uNK era menor em número no 12º e 15º ddg em relação aos animais controle na mesma área. A área 2 é aquela caracterizada como área de intensa proliferação celular em estudos anteriores (PAFFARO Jr et al., 2003, CROY et al., 2010) em camundongos prenhes normais. As alterações mais intensas percebidas pela quantificação dos subtipos de uNK em animais tratados com 75 mg/Kg de danazol foram observadas nesta área, nos quais foi observado um maior número de células uNK imaturas (subtipo 1) no início da gestação e diminuição de formas mais diferenciadas a partir do 10º ddg. De fato, vários efeitos farmacológicos de danazol

já foram descritos, incluindo inibição da liberação de gonadotrofinas, inibição competitiva de enzimas esteroidogênicas, modulação de funções imunológicas e supressão de proliferação celular (FRANCHIMONT e CRAMILION, 1977; BARBIERI et al., 1977; ROSE et al., 1988; VIGANO et al., 1994). Nossos resultados sugerem, portanto, que dosagens excessivas de danazol podem interferir com a proliferação das células uNK diminuindo seu número, o que explica a menor concentração do 8º para o 10º ddg destas células demonstrada durante a quantificação do número total das mesmas neste estudo (**Figura 21**).

Na área 3, próxima ao embrião, foram observadas as modificações mais significativas no número dos subtipos de uNK. Sendo assim, nos camundongos tratados com 0,75 mg/Kg de danazol, as células uNK dos subtipos 1, 2, 3 e 4 continuavam raras no 6º ddg (**Figura 24**). Na mesma área, foi observado um aumento significativo das células do subtipo 2 no 8º ddg e diminuição no número de uNK do subtipo 3 no 10º ddg. Quanto aos animais tratados com a dosagem fisiológica (7,5 mg/Kg), nesta área foi observado um aumento em número de uNK do subtipo 1, concomitantemente à diminuição das uNK do subtipo 3. No 10º ddg, estes animais apresentaram um maior número de células uNK do subtipo 4 e concomitante diminuição no número das células do subtipo 3 nesta área. No 12º e 15º ddg, as uNK do subtipo 3 continuaram diminuindo em número ao passo que no 15º ddg as células uNK do subtipo 4 estavam aumentadas em número em relação aos animais controle. Nos camundongos tratados com 75 mg/Kg de danazol, foi notado um aumento em número de células do subtipo 1 e concomitante diminuição das células uNK do subtipo 3 no 6º ddg. No 8º ddg, tanto o número de uNK do subtipo 1 quanto do subtipo 2 eram maiores em número que nos animais controle. As células uNK do subtipo 3 encontravam-se em menor número a partir do 10º ddg nestes animais, enquanto o número de células do subtipo 4 parecia inalterado nestes animais. Os resultados quantitativos na área 3 revelam que danazol foi capaz de aumentar o número de formas mais imaturas (subtipo 1 ou 2) de células uNK no início da gestação em todas as dosagens utilizadas. No entanto, a diminuição no número de células do subtipo 3 (mais diferenciadas) e concomitante aumento das formas conhecidas como senescentes (subtipo 4) a partir do 10º ddg, sugerem que este hormônio é capaz de acelerar a diferenciação destas células em regiões próximas ao embrião.

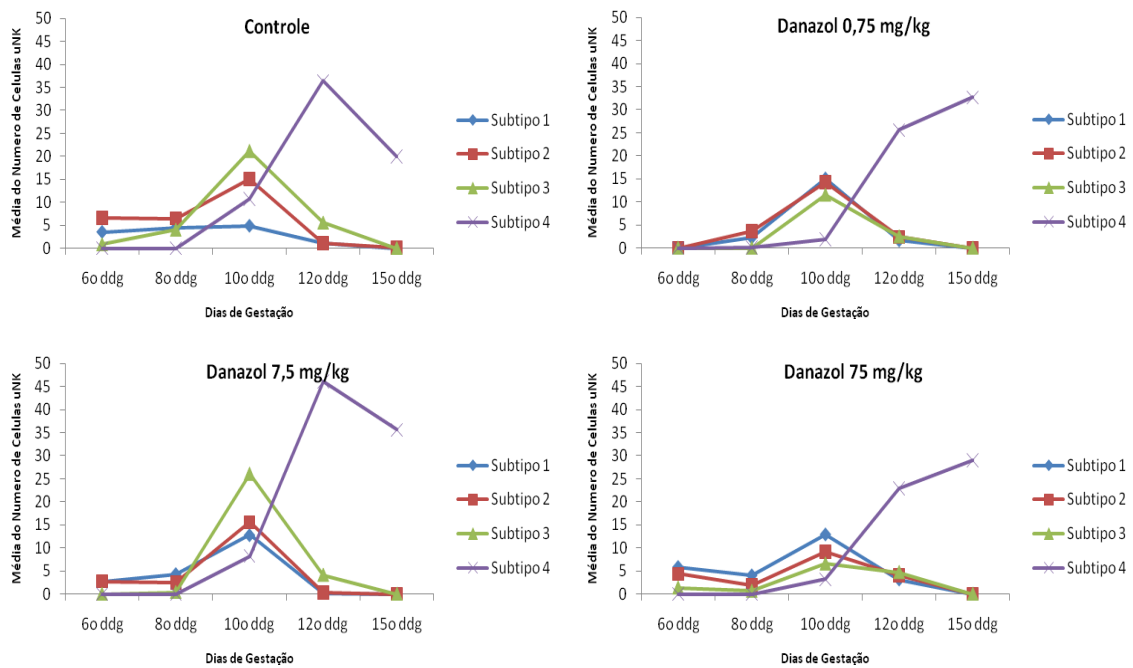


Figura 22 - Representação gráfica da distribuição na Área 1 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações

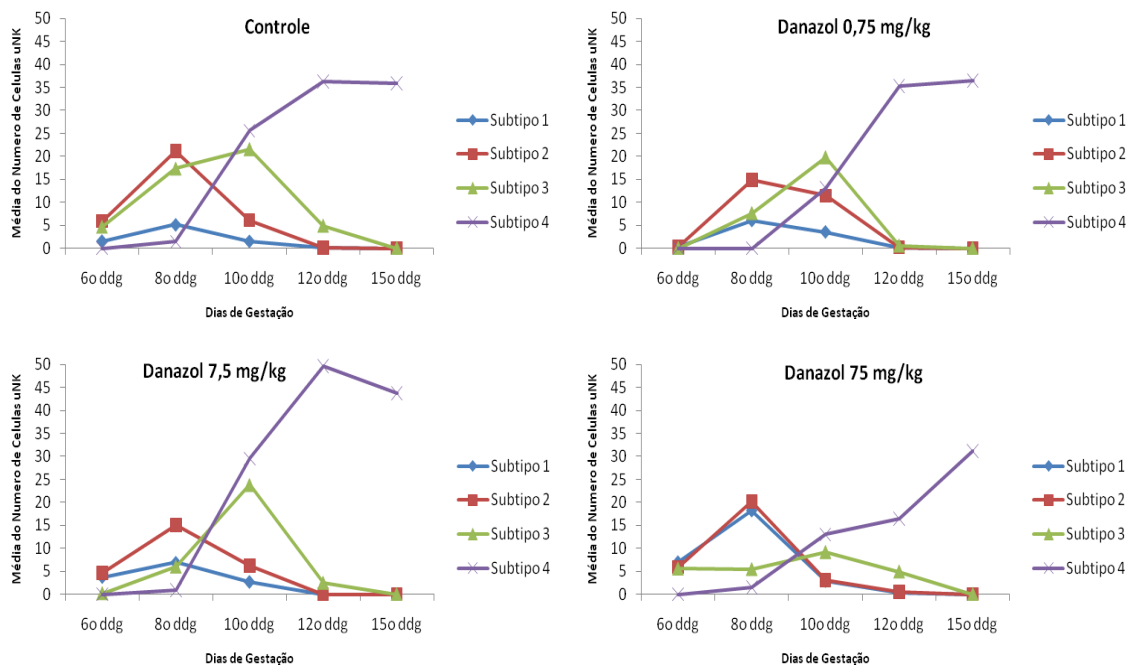


Figura 23 - Representação gráfica da distribuição na Área 2 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.

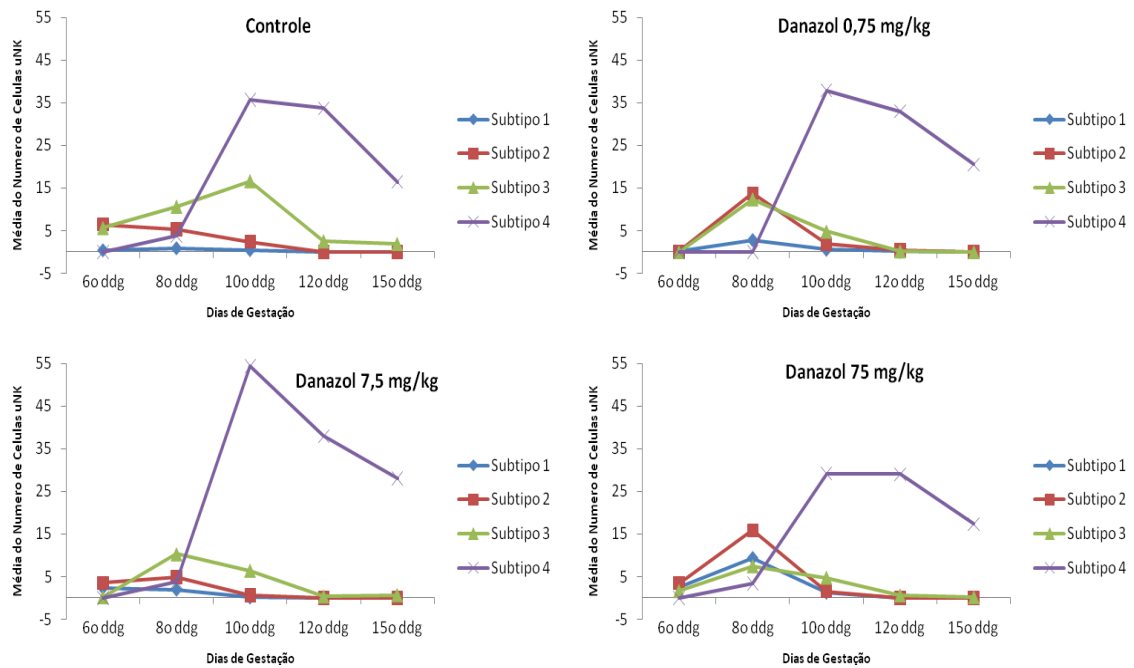


Figura 24 - Representação gráfica da distribuição na Área 3 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.

6. CONCLUSÕES

Com o conjunto de resultados obtidos no estudo morfológico, citoquímico, estereológico e comportamental de camundongos prenhes submetidos ao tratamento prévio com diferentes concentrações de danazol, podemos concluir que:

- Danazol na dosagem de 0,75 mg/Kg apresentou efeito ansiogênico e diminuiu a retenção de memória de curto prazo no período médio da prenhez decamundongos (10^o ddg). Na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento da retenção de memória a curto prazo e estado equivalente ao depressivo. A diminuição do tempo de exploração global à medida que a concentração do hormônio foi aumentada sugere efeito dose dependente de danazol no estabelecimento de estado de sonolência e apatia em camundongos no 10^o ddg.
- Danazol provocou atraso no período para sucesso da cópula, no entanto, aumentou a taxa de prenhez sem reduzir o número de corpus lúteos em todas as dosagens utilizadas, revelando a eficiência deste hormônio em melhorar a fertilidade em camundongos.
- A dosagem de 0,75 mg/Kg de danazol diminuiu as taxas de implantação e viabilidade embrionária sem contudo aumentar a perda fetal. Tais resultados revelam que esta dosagem não é a mais adequada para melhora das condições de prenhez de camundongos. As dosagens de 0,75 e 75 mg/Kg de danazol provocaram aparente diminuição dos sítios de implantação, atraso na decidualização e no adelgassamento do miométrio de camundongos, como diagnosticado no 6^o ddg. Nenhuma dosagem de danazol foi capaz de provocar perda embrionária significativa em nossos estudos.
- Nos camundongos tratados com a dosagem 7,5 mg/Kg de danazol foram observadas, a partir do 10^o ddg, muitas células grandes e de morfologia equivalente às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos que nutrem a decídua e o embrião, o que sugere que esta droga aumenta a invasividade do trofoblasto a partir do período médio da prenhez.

- Não foram observadas mudanças no padrão de reatividade da lectina DBA nos subtipos de uNK de animais tratados com danazol, o que significa que este hormônio não altera a expressão de glicoconjugados contendo n-acetilgalactosamina nestas células.
- Danazol na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento no número de células uNK, enquanto dosagens menores (0,75 mg) e maiores (75 mg) causaram diminuição neste número, demonstrando o efeito dose dependente do danazol no número de células uNK.
- O aumento em número de células uNK do subtipo 1 na área 1 no 10º ddg em todos os grupos de camundongos tratados com danazol, sugere que o tratamento com este esteróide sintético aumenta a migração de células uNK para o útero durante a gestação. A diminuição no número de células diferenciadas (subtipo 3) em regiões de proliferação (área 2) do útero de camundongos tratados com a dosagem maior de danazol, sugere que esta droga pode prejudicar a proliferação das células uNK em dosagens excessivas. Em áreas próximas ao embrião (área 3) danazol em qualquer dosagem foi capaz de aumentar o número de formas mais imaturas (subtipo 1 ou 2) de células uNK no início da gestação e diminuir o número de uNK do subtipo 3 (mais diferenciadas), concomitantemente ao aumento das formas senescentes (subtipo 4) a partir do período médio da gestação, o que sugere que este hormônio é capaz de acelerar a diferenciação destas células em regiões próximas ao embrião.
- Nossos resultados confirmam os obtidos na literatura de que a dosagem terapêutica de 7,5 mg/Kg de danazol é aquela capaz de modificar gentilmente a homeostasia uterina melhorando a fertilidade e as condições da prenhez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE H, ISHIDA Y, IWASAKI T. Perirhinal *N*-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neurosci Lett**, v. 356, p. 191–4, 2004.

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

ABRAHAMSOHN, P.A.; ZORN, T.M. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of Experimental Zoology**, v.266, p.603-28, 1993.

AGHAJANOVA, L.; HAMILTON, A.E.; GIUDICE, L.C. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.19, p. 204–211, 2008.

AHMED, A.; LI, X.F.; DUNK, C.; WHITTLE, M.J.; RUSHTON, D.I.; ROLLASON, T.; Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its flt-1 receptor in human placenta. **Growth Factors**, v.12, p.235–243, 1995.

ALBRECHT, E.D.; ABERDEEN, G.W.; NIKLAUS, A.L.; BABISCHKIN, J.S.; SURESCH, D.L.; PEPE, G.J. Acute temporal regulation of vascular endothelial growth/permeability factor expression and endothelial morphology in the baboon endometrium by ovarian steroids. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.2844–2852, 2003.

ALBRECHT, E.D.; BONAGURA, T.W.; BURLEIGH, D.W.; ENDERS, A.C.; PEPE, G.J. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. **Placenta**, v.27, p.483–490, 2006.

ALONSO, S.J.; CASTELLANO, M.A.; AFONSO, D.; RODRIQUEZ, M. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiol. Behav.** v.49, p. 69–72, 1991.

ALVES, J. A. G.; CÂMARA, L. M. C.; TELES, E. P. B.; ALVES, N. G. A Invasão trofoblástica e a sua importância clínica. **Femina**, v.31, n.10, p.881-884, 2003.

AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G.S.; CORRÊA, S.T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, v.128, n.2, p.207-18, 2004.

AMARANTE-PAFFARO, A.M.; HOSHIDA, M.S.; YOKOTA, S.; GONÇALVES, C.R.; JOAZEIRO, P.P.; BEVILACQUA, E.; YAMADA, A.T. Localization of Cathepsins D and B at the Maternal-Fetal Interface and the Invasiveness of the Trophoblast during the Post-implantation Period in the Mouse. **Cells Tissues Organs**. 2010 Nov 30. [Epub ahead of print]

ANCEL, P.; BOUIN, P. Sur l'existence d'une glande myométriale endocrine chez la lapine gestante. **CR Assoc. Anat.** (Paris) v. 13, p.97–103, 1911.

ANGOLD, A.; WORTHMAN, C.W. Puberty onset of gender differences in rates of depression: a developmental, epidemiologic and neuroendocrine perspective. **J. Affect. Disord.** v.29, p. 145–58, 1993.

AOKI, K.; KAJIURA, S.; MATSUMOTO, Y.; OGASAWARA, M.; OKADA, S.; YAGAMI, Y.; GLEICHER, N. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. **Lancet**, v. 345, p.1340-1342, 1995.

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.

APLIN, J.D.; HAIGH, T.; LACEY, H.; CHEN, C.P.; JONES, C.J.P. Tissue interactions in the control of trophoblast invasion. **J Reprod Fertil Suppl**, v.55, p.57–64, 2000.

ARCK, P.; HANSEN, P. J.; MULAC JERICJEVIC, B.; PICCINNI, 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.268-279, 2007.

BADAWY, S.I.F.; GHORAB, M.M.; ADEYEYE, C.M. Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl β -cyclodextrin coprecipitates. **International Journal of Pharmaceutics**, v.128 , p.45-54, 1996.

BARBIERI, R.L.; RYAN, K.J. Danazol: Endocrine pharmacology and therapeutic application. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 141 p. 453–463, 1981.

BARBIERI, R.L.; CANICK, J.A.; MAKRIS, A.; TODD, R.B.; DAVIS, I.J.; RYAN, K.J. Danazol inhibits steroidogenesis. **Fertility and Sterility**, v.28, p.809 –13, 1977.

BARINI, R. **Modificações hormonais e variações comportamentais na mulher**. II Encontro Brasileiro de Psicoterapia e Medicina Comportamental, Campinas 1994. Disponível em <http://www.barini.med.br>. Acesso em 07/03/2011.

BENICE, T.S.; RABER, J. Dihydrotestosterone modulates spatial working-memory performance in male mice. **Journal of Neurochemistry**. Aceito para publicação, 2009.

BERMAN, K.F. Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positron-emission tomography study in women. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, p.8836–41, 1997.

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.

BEVILACQUA, E.; HOSHIDA, M.S.; AMARANTE-PAFFARO, A.; ALBIERI-BORGES, A.; ZAGO GOMES, S. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. **Int J Dev Biol.**, v.54, n.2-3, p.495-505, 2010.

BILLINGTON, W.D. Biology of the trophoblast. **Adv. Reprod. Physiol.**, v.5, p.27-66, 1971.

BONAGURA, T.W.; PEPE, G.J.; ENDERS, A.C.; ALBRECHT, E.D. Suppression of Extravillous Trophoblast Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Uterine

Spiral Artery Invasion by Estrogen during Early Baboon Pregnancy. **Endocrinology**, v.149, n.10, p.5078–5087, 2008.

BORK, K.; BYGUM, A.; HARDT, J. Benefits and risks of danazol in hereditary angioedema: a long-term survey of 118 patients. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.100, n.2, p.153-61, 2008.

BORZYCHOWSKI, A.M., CHANTAKRU, S., MINHAS, K., PAFFARO, V.A., YAMADA, A.T., HE, H., KORACH, K.S., CROY, B.A. Functional analysis of murine uterine natural killer cells genetically devoid of oestrogen receptors. *Placenta*, v.24, n.4, p.403-11, 2003.

BOUTEILLER, P.L.; PICCINNI, M.P. Human NK cells in pregnant uterus: why There? **Am. J. Reprod Immunol**, v.59, p.401-406, 2008.

BRAR, A.K.; FRANK, G.R.; KESSLER, C.A.; CEDARS, M.I.; HANDWERGER, S. Progesterone dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. **Endocrine**, v.6, p.301-307, 1997.

BROSENS, I.A.; ROBERTSON, W.B.; DIXON, H.G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Annu**, v.1, p.177–191, 1972.

BROT, M.D.; KOOB, G.F.; BRITTON, K.T. Anxiolytic effects of steroid hormones during the estrous cycle. Interactions with ethanol. **Recent. Dev. Alcohol**, v.12, 243–59, 1995.

BROWN, J.; PAN, A.; HART, R.J. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v.8, n.12, CD008475, 2010.

BULMER, J., LASH, G. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol**, v.42, p.511-521, 2005.

BURKHARDT, 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. 2327-40, 1990.

BURKE, S.D., BARRETTE, V.F, BIANCO, J., THORNE, J.G., YAMADA, A.T., PANG, S.C., ADAMS, M.A., CROY, B.A. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. **Hypertension**, v.55, n.3, p.729-37. Epub 2010.

CAMPBELL, J.J.; BUTCHER, E.C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Curr Opin Immunol**, v.12, p.336-41, 2000.

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

CHADDHA, V.; VIERO, S.; HUPPERTZ, B.; KINGDOM, J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. **Semin Fetal Neonatal Med**, v.9, p.357-69, 2004.

CHANTAKRU, S., WANG, W.C., VAN DEN HEUVEL, M., BASCHAR, S., SIMPSON, A., CHEN, Q., CROY, B.A., EVANS, S.S. Coordinate regulation of lymphocyte-endothelial interactions by pregnancy-associated hormones. **J. Immunol.**, v.171, p.4011-9, 2003.

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.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. 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 granulosa metriais em útero de camundongos (*Mus Musculus*) prenhes. Campinas UNICAMP. Dissertação (Mestrado Biologia) **UNICAMP, Instituto de Biologia**, 1997. p. 71.

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

CROY, B. A.; ESADEG, S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.J.; PAFFARO, V. A.; HE, H.;BLACK, G.P.; ASHKAR, A.A.; KISO, Y.; ZHANG, J. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J Reprod Immunol**, v.59, p.175-191, 2003^a.

CROY, B. A.; HE, H.; ESADEG, S.; WEI, Q.; MCCARTNEY, D.; ZHANG, J.; BORZYCHOWSKI, A.; ASHKAR, A. A.; BLACK, G.P.; EVANS, S.S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL M.J.; PAFFARO, V. A.; YAMADA, A.T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, v.126, p.149-160, 2003^b.

CROY, B.A, ZHANG, J., TAYADE, C., COLUCCI, F., YADI, H., YAMADA, A.T. Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol Biol**, v. 612, p.465-503, 2010.

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.8755-8920,1997.

CULLINAN-BOVE, K.; KOOS, R.D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. **Endocrinology**, v.133, p.829–837, 1993.

DE FEO, V.J. Decidualization. In: **Cellular Biology of the Uterus**. R.M. Wynn, ed. North Holland, Amsterdam, p. 192-291, 1967.

DeLEO, V.; MORGANTE, G.; LANZETTA, D. et al. Danazol administration after gonadotrophin-releasing hormone analogue reduces rebound of uterine myomas. **Human Reproduction**, v.11, p.101-4, 1997.

DEY, S.K.; LIM, H.; DAS, S.K.; REESE, J.; PARIA, B.C.; DAIKOKU, T.; WANG, H. Molecular cues to implantation. **Endocr. Rev.**, v.25, p.341-373, 2004.

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

DIMITRIADIS, E., WHITE, C.A, JONES, R.I, SALAMONSE, I.A., Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. **Hum. Reprod. Update.**, v.11, p.613-630, 2005.

DMOWSKI, W.P. Danazol. A synthetic steroid with diverse biologic effects. **J Reprod Med**, v.35, p.69-74; discussion 74-75, 1990.

DODIN, S.; LEMAY, A.; MAHEUX, R.; DUMONT, M.; TURCOT-LEMAY, L. Bone mass in endometriosis patients treated with GnRH agonist implant or danazol. **Obstet. Gynecol.**,v.77, p. 410-415, 1991.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L.C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endocr Rev.**, v.26, p.44-62, 2005.

DUNN, C.L.; CRITCHLEY, H.O.; KELLY, R.W. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.1898-1901, 2002.

FERRAZ, T.M. **Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos.** Dissertação de Mestrado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP. São Paulo, 2006.

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

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

FINN, C.A. 1977. The implantation reaction. In: **Biology of the Uterus**. Winn, RM, ed. Plenum Press. New York, p.245-308, 1977.

FINN, C.A. Biology of decidual cells. **Adv. Reprod. Physiol.**, v.5, p.1-26, 1971.

FITZGERALD, J.S.; POEHLMANN, T.G; MARKERT, U.R. Trophoblast invasion. **Mod. Asp.Immunobiol**, v.19, p.12, 2006.

FOECKING, E.M.; MCDEVITT, M.A.; ACOSTA-MARTÍNEZ, M.; HORTON, T.H.; LEVINE, J.E. Neuroendocrine Consequences of Androgen Excess in Female Rodents. **Horm Behav**, v.53, n.5, p.673–92, 2008.

FRANCHIMONT, P.; CRAMILION, C. The effect of danazol on anterior pituitary function. **Fertil Steril.**, v.28, p.814–17, 1977.

FRANCO, H.L.; DAI, D.; LEE, K.Y.; RUBEL, C.A.; ROOP, D.; BOERBOOM, D.; JEONG, J.W.; LYDON, J.P.; BAGCHI, I.C.; BAGCHI, M.K.; DEMAYO, F.J. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. **FASEB J.**, v.25, n.4, p.1176-87, 2011.

FRYE, C. A.; LACEY, E. H. Posttraining androgens enhancement of cognitive performance is temporally distinct from androgens increases in affective behavior. **Cogn Affect Behav Neurosci**, v.1, p. 172-182, 2001.

FRYE, C. A.; SELIGA, A. M. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. **Cogn Affect Behav Neurosci**, v.1, p.371-381, 2001.

FRYE, C.A.; WALF, A.A. Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdale can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. **Behav Neurosci.**, v.118, p.306-13, 2004.

FUKUI, A.; FUJI, S.; YAMAGUCHI, E.; KIMURA, H.; SATO, S.; SAITO, Y. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing *in vitro* fertilization. **Am J Reprod Immunol**, v.41, p.413-422, 1999.

GELLERSEN, B.; BROSENS, J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross talk in human endometrium: a decidualizing affair. **J. Endocrinol.**, v.178, p.357-372, 2003.

GEORGIADES, P.; WATKINS, M.; BURTON, J.; FERGUSON-SMITH. Roles fogenomics imprinting and the zygotic genome in placental development. **Pro Natl Acad Sci**, v.98, p.4522-7, 2001.

GIBBS, R. B. Testosterone and estradiol produce different effects on cognitive performance in male rats. **Horm Behav**, v. 48, p.268-277, 2005.

GIBBS, R.B.; GABOR, R. Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. **J Neurosci Res.**, v.74, p.637–43, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A., BRANCO, L.G., DE CASTRO, M., ANTUNESRODRIGUES, J., CARNIO, E.C. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.447, p.175–80, 2003.

GODBOLE, G.; SUMAN, P.; GUPTA, S.K.; MODI, D. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 4, 2011.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T.I.; MANASTER, I.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental process at the human fetal-maternal interface. **Nat Med**, v.12, p. 1065-1074, 2006.

HEBBARD, P. C.; KING, R. R.; MALSBURY, C. W.; HARLEY, C. W. Two organizational effects of pubertal testosterone in male rats: transient social memory and a shift away from long-term potentiation following a tetanus in hippocampal CA1. **Exp. Neurol.**, v.182, p.470-475, 2003.

HELIGE, C.; AHAMMER, H.; HAMMER, A.; HUPPERTZ, B.; FRANK, H.; DOHR, G. Trophoblastic invasion in vitro and in vivo: similarities and differences. **Hum Reprod**, v.23, p.2282–91, 2008.

HENDERSON, T.A.; SAUNDERS, P.T.K.; MOFFET-KING, A.; GROOME, N.P.; CRITCHLEY, H.O.D. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.88, n.1, p.440-449, 2003.

HOOPER, W.D.; EADIE, M.J.;DICKINSON, R.G. Single oral dose pharmacokinetics and comparative bioavailability of danazol in humans. **Biopharm. Drug Disp.**, v.12, p. 577-582, 1991.

HUGHES, E.; BROWN, J.; TIFFIN, G. Danazol for unexplained subfertility. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, p.1-5, 2009.

JABBOUR, H.N.; KELLY, R.W.; FRASER, H.M.; CRITCHLEY, H.O. Endocrine regulation of menstruation. **Endocr. Rev.**, v.27, p.17-46, 2006.

KALKUNTE, S.; CHICHESTER C.O.; GOTSCH, F.; SENTMAN, C.L.; ROMERO, R.; SHARMA, S., Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. **Am. J. Reprod. Immunol**, v.59, p.425-432, 2008.

KAMMERER, U., VON WOLFF, M., MARKERT, U.R. Immunology of human endometrium. **Immunobiology**, v.209, p.569-574, 2004.

KANE, N.; KELLY, R.; SAUNDERS, P, T.K.; CRITCHLEY, H.O.D. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by hCG and mediated via the mannose receptor. **Endocrinology**. v.150, n.6, p.2882-8, 2009.

KATSUKI, Y.; TAKANO, Y.; FUTAMURA, Y.; SHIBUTANI, Y.; AOKI, D.; UDAGAWA, Y.; NOZAWA, S. Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. **Eur J Endocrinol.**, v.138, n.2, p.216-26, 1998.

KATZ, S. Extracellular and intracellular degradation of collagen by trophoblast giant cells in acute fasted mice examined by electron microscopy. **Tissue e Cell**, v.27, p.713-21, 1995.

KEENAN, P.A. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. **Psychoneuroendocrinology**, v.26, p.577-90, 2001.

KESKIN, D.B., ALLAN, D.S.J.; RYBALOV, B.; ANDZELM, M.M.; STERN, J.N.H.; KOPCOW, H.D.; KOOPMAN, L.A.; STROMINGER, J.L. TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. **PNAS**, v.104, n.9, p.3378-3383, feb 2007.

KESSLER, R.C.; MCGONAGLE, K.A.; SWARTZ, M.; BLAZER, D.G.; NELSON, C.B. Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **J. Affect. Disord**, v.29, p.85-96, 1993.

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.

KIMBER, S.J. Leukemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. **Reproduction**, v.130, p.131-145, 2005.

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

KING, A., HIBY, S. E., GARDNER, L., JOSEPH, S., BOWEN, J. M., VERMA, S., BURROWS, T. D., LOKE, Y. W. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors. **Placenta**, v.21, p. S 81-85, 2000.

KING, A.; BURROWS, T; VERMA, S.; HIBY, S.; LOKE, Y.W. Human uterine lymphocytes. **Hum Reprod Update**, v.4, p.480-485, 1998.

KING, A.; GARDNER, L.; LOKE, Y.W. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Human Reproduction**, v.11, n.5, p.1079-1082, 1996.

KIRBY, D.R.S.; COWELL, T.P. Trophoblast-host interactions. In: FLEISCHMAJER R, BILLINGHAM RE. (eds) **Ephitelial- mesenchymal interactions**. Williams e Wilkins, Baltimore, p. 64-77, 1968.

KIRWAN, S.E. e BURSHTYN, D.N. Regulation of natural killer cell activity. **Current Opinion Immunology**, v.19, p. 46-54, 2006.

KITAYA, K., NAKAYAMA, T., OKUBO, T., KUROBOSHI, H., FUSHIKI, S., HONJO, H. Expression of macrophage inflammatory protein – 1beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. **J. Clin Endocrinol Metab.**, v.88, p. 1809-14, 2003.

KITAYA, K.; YAMAGUCHI, T.; YASUO,T.; OKUBO,T.; HONJO,T.H. Post-ovulatory rise of endometrial CD16(-) natural killer cells: In situ proliferation of residual cells or selective recruitment form circulating peripheral blood. **J Reprod Immunol**, v.76, p.45-53, 2007.

KOROL, D.L. Role of estrogen in balancing contributions from multiple memory systems. **Neurobiol Learn Mem**, v.82, p.309–23, 2004.

KRITZER, M. F.; McLAUGHLIN, P. J.; SMIRLIS, T.; ROBINSON, J. K. Gonadectomy impairs Tmaze acquisition in adult male rats. **Horm Behav**, v.39, p.167-174, 2001.

KUANG, H., PENG, H., XU, H., ZHANG, B., PENG, J., TAN, Y. Hormonal regulation of uterine natural killer cells in mouse preimplantation uterus. **J Mol Histol.**, v.41, n.1, p.1-7, 2010.

KUSAKABE, K.; MORISHIMA, S.; NAKAMUTA, N.; LI, Z.L.; OTSUKI, Y. Effect of danazol on NK cells and cytokines in the mouse uterus. **J Reprod**, v.53, n.1, p.87-94, 2007.

LANIER L.L. 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.

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, G.F.; SCHIESSL, B.; KIRKLEY, M.; INNES, B.A.; COOPER, A.; SEARLE, R.F.; ROBSON, S.C.; BULMER, J.N. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J Leukoc Biol**, v.80, p.572-580, 2006.

LEVI SETTI, P.E.; COLOMBO, G.V.; SAVASI, V.; BULLETTI, C.; ALBANI E.; FERRAZZI, E. Implantation failure in assisted reproduction technology and a critical approach to treatment. **Ann NY Acad Sci**, v.1034, p.184–99, 2004.

LEVINE, R.J.; MAYNARD, S.E.; QIAN, C.; LIM, K.H.; ENGLAND, L.J.; YU, K.F.; SCHISTERMAN, E.F.; THADHANI, R.; SACHS, B.P.; EPSTEIN, F.H.; SIBAI, B.M.; SUKHATME, V.P.; KARUMANCHI, S.A. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, v.350, p.672–683, 2004.

LIBRACH, C.L.; WERB, Z.; FITZGERALD, M.L.; CHIU, K.; CORWIN, N.M.; ESTEVES, R.A. et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. **J Cell Biol**, v.113, p.437–49, 1991.

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

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

LOKE, Y.W., KING, A., BURROWS, T.D. Decidua in human implantation. **Hum Reprod**, v.10 (Suppl. 2), p.14–21, 1995.

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

LUCION, A.B.; CHARCHAT, H.; PEREIRA, G.A.M.; RASIA-FILHO, A.A. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiol. Behav**, v.60, p.1419–23, 1996.

LUNDKVIST, O. Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. **Biol. Reprod.**, v.18, p.306-16, 1978.

MARVAN, M.L.; CHAVEZ-CHAVEZ, L.; SANTANA, S. Clomipramine modifies fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. **Arch. Med. Res.**, v. 27, 83–7, 1996.

MATSUBAYASHI, H.; MAKINO, T.; IWASAKI, K.; MARUYAMA, T.; OZAWA, N.; HOSOKAWA, T.; SOMEYA, K.; NOZAWA, S. Leukocyte subpopulation changes in rats with autotransplanted endometrium and the effect of danazol. **Am J Reprod Immunol**, v.33, p.301-314, 1995.

MAURER, M., VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int. J. Biochem Cell Biol**, v.36, p.1882-6, 2004.

McMASTER, M.T.; ZHOU, Y.; FISHER, S.J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Semin Nephrol**, v.24, p.540–7, 2004.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v.2, p.656-663, 2002.

MORGANTE, G.; DITTO, A.; LaMARCA, A.; DeLEO, V. Low-dose danazol after combined surgical and medical therapy reduces the incidence of pelvic pain in women with moderate and severe endometriosis. **Human Reproduction**, v.14, n.9, p.2371-4, 1999.

MOSER, G.; GAUSTER, M.; ORENDI, K.; GLASNER, A.; THEUERKAUF, R.; HUPPERTZ, B. Endoglandular trophoblast an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with the novel confrontation co-culture models. **Hum Reprod**, v.25, p.1127–36, 2010.

MSELLE, T.F.; MEADOWS, S.K.; ERIKSSON, M.; SMITH, J.M.; SHEN, L.; WIRA, C.R.; SENTMAN, C.L.; Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. **Clin Immunol**, v.124, p.69-76, 2007.

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.

MUNTENER, M.; HSY, Y.C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anat.**, v.98, p.241-52, 1977.

MURAKAMI, K.; NOMURA, K.; SHINOHARA, K.; KASAI, T.; SHOZU, M.; INOUE, M. Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis-derived stromal cells by a competitive mechanism. **Fertility and Sterility**, v.86, N.2, 2006.

MUSICH, J.R.; BEHRMAN, S.J.; MENON, K.M.J. Estrogenic and antiestrogenic effects of danazol administration in studies of estradiol receptor binding. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.140, n.1, p.62-9, 1981.

NEGAMI, A.I.; SASAKI, H.; TOMINAGA, T. Therapeutic effects of danazol on endometrial cells may be activated by the presence of extracellular matrix. **Am J Obstet Gynecol.**, v.169, n.3, p.739-43, 1993.

NIKLAUS, A.L.; ABERDEEN, G.W.; BABISCHKIN, J.S.; PEPE, G.J.; ALBRECHT, E.D. Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stromal cells in the baboon endometrium. **Biol Reprod**, v.68, p.1997–2004, 2003.

OKADA, H.; NAKAJIMA, T.; SANEZUMI, M.; IKUTA, A.; YASUDA, K.; KANZAKI, H. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, p.4765-4770, 2000.

OLSSON, J.H.; HILLENSJÖ, T.; NILSSON, L. Inhibitory effects of danazol on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. **Fertil Steril**, v.46, n.2, p.237-42, 1986.

OTA, H.; IGARASHI, S.; HAYAKAWA, M.; MATSUI, T.; TANAKA, H.; TANAKA, T. Effect of danazol on the immunocompetent cells in the eutopic endometrium in patients with endometriosis: a multicenter cooperative study. **Fertil Steril**, v.65, p.545-551, 1996.

PAFFARO JR, V.A.; BIZINOTTO, M.C.; JOAZEIRO, P.P.; YAMADA, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v.24, p.479-88, 2003.

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.

PARRILLO, J.E.; PARKER, M.M.; NATANSON, C. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med.**, v.113, p.227–42, 1990.

PASCHOALINE, M. A. Fertilização, 2009. <http://www.slidefinder.net/f/fertilizacao2009/30790131/p5>. Acesso em 28/02/2011

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*, v.115, 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.

PEEL, S; BULMER, D. Proliferation and differentiation of the trophoblast in the establishment of the rat chorio-allantoic placenta. *J. Anat.*, v.124, p.675-87, 1977.

PHARMACY HEALTH. Danazol. 2003. Disponível em: <http://www.pharmacyhealth.net/d/danazol-2973.htm>. Acesso em 15 de abril de 2011.

PIJNENBORG, R. The human decidua as a passage-way for trophoblast invasion. *Trophoblast Res.*, v.11, p.229-41, 1998.

POPOVICI, R.M., KAO, L.C., GIUDICE, L.C. Discovery of new inducible genes in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology*, v.141, p.3510-3, 2000.

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

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

RED-HORSE, K., DRAKE, P.M., FISHER, S.J. Human pregnancy: the role of chemokine networks at fetal-maternal interface. *Exp Reviews*, v.6, p.1-14, 2004.

REDLINE, R. W.; 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.

REYNOLDS, L.P.; KIRSCH, J.D.; KRAFT, K.C.; REDMER, D.A. Time-course of the uterine response to estradiol-17 α in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol Reprod*, v.59, p.613–620, 1998.

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

ROSE, G.L.; WHITE, J.O.; DOWSETT, M.; JEFFCOATE, S.L.; MUDGE, J.E. The inhibitory effects of danazol, danazol metabolites, gestrinone, and testosterone on the growth of human endometrial cells in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 49, p.224–8, 1988.

SANOFI-SYNTHELABO Inc. **Danazol.** New York, 1996. Disponível em: <http://products.sanofi-aventis.us/danazol/danazol.html>. Acesso em 12 de junho de 2010.

SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J.C. Aspectos da imunologia da gravidez. **Acta Med Port**, v. 20, p.355-358, 2007.

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

SHANG, X.L.; ZHAO, J.H.; CAO, Y.P.; XUE, Y.X. Effects of synaptic plasticity regulated by 17beta-estradiol on learning and memory in rats with Alzheimer's disease. **Neurosci Bull.**, v.26, n.2, p.133-9, 2010.

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.

SPENCER, J.L.; WATERS, E.M.; MILNER, T.A.; MCEWEN, B.S. Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. **Neuroscience**, v. 155, n.4, p. 1106-19, 2008.

SPRITZER, M. D.; GILL, M.; WEINBERG, A.; GALEA, L. A. Castration differentially affects spatial working and reference memory in male rats. **Arch. Sex. Behav.**, v.37, n.1, p.19-29, 2008.

STAUN-RAM, E.; SHALEV, E. Human trophoblast function during the implantation process. **Reprod Biol Endocrinol**, v.3, p.56–67, 2005.

STEINER, M.; DUNN, E.; BORN, L. Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. **J Affective Disord**, v.74, p.67-83, 2003.

STEWART, I.; PEEL, S. Granulated metrial cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. **J Anat**, v.133, p.535-41, 1981.

SURREY, E.S.; HALME, J. Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. **Fertil Steril**, v.58, n.2, p.273-8, 1992.

SZCZYGIET, M. e KURPISZ, M. Chromosomal anomalies in human gametes and pre-implantation embryos, and their potential effect on reproduction. **Andrologia**, v.33, p.249–65, 2003.

TAKEI, F.; BRENNAN, J.; MAGER, D.L. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. **Immunol Rev**, v.55, p.67-77, 1997.

TAMAYA, T.; WADA, K.; FUJIMOTO, J.; YAMADA, T.; OKADA, H. Danazol binding to steroid receptors in human uterine endometrium. **Fertil Steril.**, v.41, n.5, p.732-5, 1984.

TEI, C.; MIYAZAKI, T.; KUJI, N.; TANAKA, M.; SUEOKA, K.; YOSHIMURA Y. Effect of danazol on the pregnancy rate in patients with unsuccessful *in vitro* fertilization-embryo transfer. **J Reprod Med**, v.43, p.541-546, 1998.

THOMAS, G.W.; RAEL, L.T.; SHIMONKEVITZ, R.; CURTIS, C.G.; BAR-OR, R.; BAR-OR, D. Effects of danazol on endothelial cell function and angiogenesis. **Fertility and Sterility**, v.88, Suppl 2, 2007.

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

TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity.**, v.15, p.363-74, 2001.

VALBUENA, D.; JASPER, M.; REMOHI, J.; PELLICER, A.; SIMON, C. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. **Hum Reprod**, v.14(Suppl. 2), p.107–11, 1999.

VAN DEN HEUVEL, M.J.; XIE, X.; TAYADE, C.; PERALTA, C.; FANG, Y.; LEONARD, S. PAFFARO, V.A.; SHEIKHI, A.K.; MURRANT, C.; CROY, B.A.; A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **Am J Reprod Immunol**, v.54, p.322-331, 2005.

VAN MOURIK, M.S.M., MACKLON, N.S., HEIJNEN, C.J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, v.85, p. 4-16, 2009.

VIGANO, P.; DiBLASIO, A.M.; BUSACCA, M.; VIGNALI, M. Immunosuppressive effect of danazol lymphocyte-mediated cytotoxicity toward human endometrial stromal cells. **Gynecol Endocrinol** , v.8, p.13–9, 1994.

VOULLAIRE, L.; WILTON, L.; MCBAIN, J.; CALLAGHAN, T.; WILLIAMSON, R. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. **Mol.Hum.Reprod.**, v.8, p.1035-41, 2002.

WALF, A.A.; RHODES, M.E.; FRYE, C.A. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized hormone-primed rats. **Neurobiol Learn Mem.**, v.86, p.35-46, 2006.

WANG, C.; TANAKA, T.; NAKAMURA, H.; UMESAKI, N.; HIRAI, K.; ISHIKO, O.; OGITA, S.; KANEDA, K. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics and the functional role in angiogenesis during pregnancy. **Microscopy Research and Technique**, v.60, p.420-429, 2003.

WEISSMAN, M.M.; BLAND, R.; JOYCE, P.R.; NEWMAN, S.; WELLS, J.E.; WITTCHEM, H.A. Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. **J. Affect. Disord.**, v.29, p.77–84, 1993.

WELLS, M. The pathology of gestational trophoblastic disease: recent advances. **Pathology**, v. 39, p.88–96, 2007.

WHITELAW, P.F.; CROY, B.A. Granulated lymphocytes of pregnancy. **Placenta**, v.17, p.533–543, 1996.

WILLIAMS, J.B.W.; SPITZER, R.L.; LINZER, M. et al. Gender differences in depression in primary care. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.173, p.654–9, 1995.

WU, X., WEI, H., ZHANG, J.; TIAN, Z. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cell Mol Immunol**, v.3, p.131-7, 2006.

YADI, H.; BURKE, S.; MADEJA, Z.; HEMBERGER, M.; MOLFETT, A.; COLUCCI, F. Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **The journal of immunology**, v. 181, p.6140-6147, 2008.

YAMASHITA, S.; OHNO, Y.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, Y.; KOISHI, K.; KAWASHIMA, M.; HOSOKAWA, K.; OKADA, H. Antiestrogenic effects of danazol on rabbit uterus. **Gynecol Obstet Invest.**, v.38, n.4, p.245-8, 1994.

ZAVAN, B. **Estudo Morfofisiológico e comportamental após inflamação induzida pelo Lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação de camundongos.** Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas pela Sociedade Brasileira de Fisiologia – Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Alfenas, 2011.

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.

ZHOU, Y.; BELLINGARD, V.; FENG, K.T.; MCMASTER, M.; FISHER, S.J. Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang 2, PIGF, and VEGF-C. **Dev Biol**, v.263, p.114–125, 2003.

ZHOU, Y.; MCMASTER, M.; WOO, K.; JANATPOUR, M.; PERRY, J.; KARPANEN, T.; ALITALO, K.; DAMSKY, C.; FISHER, S.J. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated

in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am J Pathol**, v.160, p.1405–1423, 2002.

APÊNDICE



We certify that

TAVARES, P. E., AMARANTE-PAFFARO A.M., PAFFARO-JR, V. A.

Organizing Committee

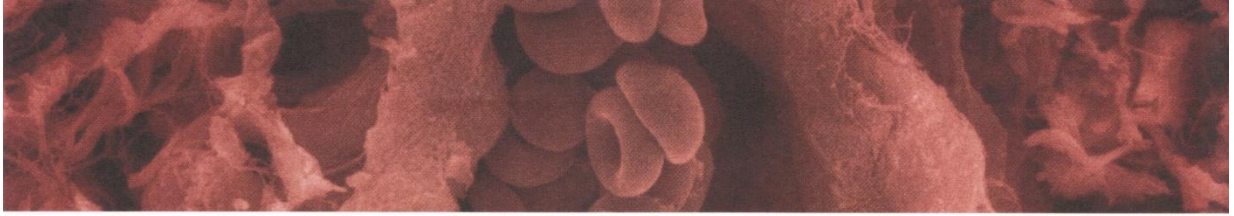
Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi

presented the Poster entitled

Morphofisiologic changes in pregnant mice after prior treatment with danazol

at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.

**President
Organizing Committee
SBBC 2010**




FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

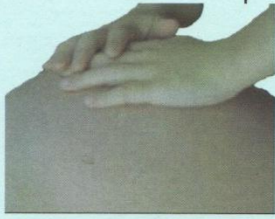
o resumo 05.002 intitulado ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO PRÉVIO COM DANAZOL de autoria Tavares, E. P., Amarante-paffaro, A. M., Giusti-paiva, A., Paffaro Jr, V. A. - Depto de Ciências Biomédicas, UNIFAL-MG Faculdade de Odontologia, UNIFENAS, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.



Comissão Organizadora





V Seminário em Interação Materno-Fetal Pesquisa Básica & Clínica em Biologia da Reprodução

Certificado

Tavares EP; Salles ESL, Lima PNT; Amarante-Paffaro AM; Giusti-

Paiva A; Paffaro Jr. VA participaram do **V Seminário em Interação Materno-Fetal: Pesquisa Básica & Clínica em Biologia da Reprodução**, realizado nos dias 15 e 16 de outubro de 2010 na Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, apresentando o trabalho: Morphophysiological and behavioral aspects of mice pregnancy after prior treatment with danazol.

São Paulo, 16 de Outubro de 2010.

Comissão Organizadora