

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**TAIS SILVA BERNARDES**

**A EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO IMPLANTACIONAL DE  
CAMUNDONGOS ALTERA AS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS?**

**ALFENAS/MG**

**2024**

**TAIS SILVA BERNARDES**

**A EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO IMPLANTACIONAL DE  
CAMUNDONGOS ALTERA AS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado como requisito para obtenção do grau de bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Discente: Tais Silva Bernardes.

Orientador: Prof Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

**ALFENAS/MG**

**2024**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Bernardes, Tais Silva.

A exposição ao frio durante o período implantacional de camundongos altera as Células Natural Killer uterinas? / Tais Silva Bernardes. - Alfenas, MG, 2024.

44 f. : il. -

Orientador(a): Valdemar Antônio Paffaro Júnior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -  
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Exposição ao frio. 2. Gestação. 3. Lectina DBA. 4. Morfologia. I. Paffaro Júnior, Valdemar Antônio, orient. II. Título.

**TAIS SILVA BERNARDES**


**A EXPOSIÇÃO AO FRIO DURANTE O PERÍODO IMPLANTACIONAL DE  
CAMUNDONGOS ALTERA AS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS?**

O Presidente da banca examinadora abaixo  
assina a aprovação do(a) Trabalho de  
Conclusão de Curso apresentado(a) como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Bacharel Biomedicina pela Universidade  
Federal de Alfenas.

Aprovada em: 10 de Dezembro de 2024


Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente  
 VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR  
Data: 20/11/2025 14:49:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Cristina Bizinotto de Assunção  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente  
 MARCIA CRISTINA BIZINOTTO DE ASSUNCAO  
Data: 21/11/2025 10:46:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MS. Raíne Piva Amaral  
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Documento assinado digitalmente  
 RAINE PIVA AMARAL  
Data: 28/11/2025 17:53:18-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família que sempre me deu suporte e amor, que são as pessoas mais importantes que eu tenho e pra quem eu posso recorrer sempre que eu precisar, que são minha casa e meu refúgio: Minha mãe Waldirene, por sempre ter me apoiado e confiado em mim, Tia Lu, Tio Waldir, Tio Piu, Vô Bedito, Nathy, Murilo, Pietro, Diego, Enrico, Yuri e toda a família do meu pai. À minha Vó Lúcia, por ter acreditado em mim em todos os momentos, até quando eu não tinha tanta certeza. Tem um pouquinho da senhora em tudo que eu faço.

Agradeço às minhas amigas Bianca, Mayara e Bárbara por estarem comigo em diferentes momentos da minha vida e por ainda permanecer aqui até hoje, apesar da distância. A Giulia e a Ilíada por terem tornado a vida em Alfenas mais fácil, obrigada por ter dividido os momentos de choro e de alegria, que nossa conexão possa durar a vida toda. A Júlia e a Francine por terem dividido a casa e a vida comigo durante todos esses anos, obrigada por todos os momentos vividos.

Agradeço ao Sergio por ser de longe a melhor pessoa que eu conheço. Ter te conhecido no meio dessa jornada, fez tudo ser diferente e ter um sentido ainda mais especial. Obrigada por toda a paciência, amor, tranquilidade, felicidade e suporte que você me dá, uma vida ao seu lado ainda é pouco. Te amo e te admiro.

Agradeço ao meu orientador Júnior por todo conhecimento, paciência, confiança e momentos com conversas descontraídas. Obrigada por ser tão presente e por ter me dado a oportunidade de desenvolver uma pesquisa na área que eu amo. Você é um excelente professor e orientador.

Por fim, agradeço a UNIFAL-MG por ter sido um espaço de muito crescimento, que por muito tempo foi apenas um sonho e hoje é parte de uma das minhas maiores realizações!

“O segredo, querida Alice, é rodear-se de pessoas que te façam sorrir o coração”.  
(Alice no País das Maravilhas)

## RESUMO

A exposição prolongada ao frio resulta na quebra da homeostasia em mamíferos, gerando estresse metabólico e fisiológico. Considerando que estressores durante a gravidez podem promover a diminuição dos níveis hormonais maternos através da desregulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG), acredita-se que o frio possa afetar a viabilidade gestacional, principalmente quando se refere ao período de implantação. As Células Natural Killer Uterina (uNK), desempenham funções importantes na gestação, como remodelamento vascular e manutenção decidual, e têm sua proliferação influenciada pelos hormônios ovarianos, seja por uma ação direta ou indireta. Nesse estudo, investigamos a possível influência do frio na quantidade e função das Células Natural Killer Uterinas e seus impactos na morfologia das arteríolas espiraladas uterinas e do útero. Para isso, foram utilizadas 30 fêmeas da linhagem swiss, que foram acasaladas e divididas em um grupo controle (GC) e um grupo de exposição (G2). Todo o grupo G2 foi pesado antes e depois da exposição ao frio, em todos os dias, sendo exposto do 1º dg ao 7º dg em câmara fria a 4°C por 8 horas e perfundidas nos dias 8º 11º e 15º dg. A análise macroscópica dos Sítios de Implantação foi feita, para avaliar possíveis áreas hemorrágicas, e o número de sítios de implantação dos dois grupos foi quantificado. O material coletado consistia nos sítios de implantação do 8º e 11º dg e na placenta do 15º dg, sendo incluído em parafina e seccionado em 6µm para confecção de lâminas. As lâminas foram submetidas a análise histológica com citoquímica com o uso de Lectina DBA para analisar a morfologia e estereologia das uNK e coloração com eosina e hematoxilina para análise da morfometria das arteríolas. Como resultado foi observado que a alteração do peso antes e depois da exposição ao frio não foi significativa, apesar de ter diminuído na maioria dos animais após o tempo no frio. O número de sítios de implantação entre o controle e o G2 não variou. Foram observados sítios de implantação com áreas hemorrágicas em quase todos os animais de todos os 3 dias avaliados, e a área da parede das arteríolas espiraladas uterinas diminuiu de forma significativa no 8º dg (G2) o que não ocorreu no 11º e 15º dg. Observou-se a presença dos 4 subtipos de uNK no grupo exposto, porém não houve diferença significativa na sua quantidade e nem no número total de células. Esses resultados sugerem que o frio não altera a quantidade e função das uNK, porém pode afetar a saúde gestacional por outras vias, levando à vasoconstrição das arteríolas e hemorragia nos sítios de implantação.

**Palavras-chaves:** Exposição ao frio; Gestação; Lectina DBA; Morfologia

## ABSTRACT

Prolonged exposure to cold disrupts homeostasis in mammals, causing metabolic and physiological stress. Considering that stressors during pregnancy may promote a decrease in maternal hormone levels through the dysregulation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) axis, it is believed that cold exposure may affect gestational viability, especially in relation to the implantation period. Uterine Natural Killer (uNK) cells play important roles in pregnancy, such as vascular remodeling and decidual maintenance, and their proliferation is influenced by ovarian hormones, either directly or indirectly. In this study, we investigated the possible influence of cold on the quantity and function of Uterine Natural Killer Cells and their impact on the morphology of uterine spiral arterioles and the uterus. To this end, 30 female Swiss mice were used, mated, and divided into a control group (CG) and an exposure group (G2). All animals in group G2 were weighed before and after cold exposure each day, being exposed from day 1 post-coitum (1 dpc) to day 7 post-coitum (7 dpc) in a cold chamber at 4°C for 8 hours, and perfused on days 8, 11, and 15 dpc. A macroscopic analysis of the implantation sites was conducted to evaluate possible hemorrhagic areas, and the number of implantation sites in both groups was quantified. The collected material consisted of implantation sites from days 8 and 11 dpc and the placenta from day 15 dpc, sectioned at 6  $\mu$ m and embedded in paraffin to prepare slides. The slides underwent histological analysis with cytochemistry using DBA lectin to examine the morphology and stereology of uNK cells and staining with eosin and hematoxylin for the morphometric analysis of arterioles. The results showed that weight change before and after cold exposure was not significant, although it decreased in most animals after the cold exposure period. The number of implantation sites did not differ between the control and G2 groups. Implantation sites with hemorrhagic areas were observed in almost all animals on all 3 evaluated days, and the area of the uterine spiral arteriole wall decreased significantly on day 8 dpc (G2), which was not observed on days 11 and 15 dpc. The presence of all 4 subtypes of uNK cells was observed in the exposed group; however, there was no significant difference in their quantity or total cell number. These results suggest that cold does not directly affect the quantity and function of uNK, but may affect gestational health through other pathways, leading to vasoconstriction in arterioles and hemorrhage at implantation sites.

**Keywords:** DBA Lectin; morphology; gestation; cold exposure.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões do Sítio de Implantação pela citoquímica com lectina DBA.....	24
Figura 2 - Número e áreas hemorrágicas dos sítios de implantação.....	26
Figura 3 - Áreas hemorrágicas em lâminas coradas com Eosina Hematoxilina de animais do 11°dg e 15°dg (G2).....	27
Figura 4 - Peso dos animais em grama (g) antes e depois da exposição ao frio do 1° ao 7° dia de gestação.....	28
Figura 5 - Morfologia das Células uNK DBA+.....	29
Figura 6 - Número de células uNK do subtipos 1, 2, 3 e 4 nas regiões 1, 2 e 3 nos sítios de implantação de 8°dg, 11°dg e 15°dg .....	30
Figura 7 - Número total das Células uNK nos 3 dias de gestação.....	31
Figura 8 - Corte histológico de Sítio de implantação do 11°dg de animais do grupo G2.....	32
Figura 9 - Cortes histológicos de sítios de implantação de 8° dg submetidos à coloração de HE.....	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
2.1	A EXPOSIÇÃO AO FRIO E A GESTAÇÃO.....	13
2.2	AS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINA (uNK) E SUAS FUNÇÕES...	15
2.3	A EXPOSIÇÃO AO FRIO E AS CÉLULAS uNK.....	17
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	20
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
5.1	ANIMAIS.....	21
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	21
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5.4	ANÁLISE DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E PESO (g) DAS FÊMEAS...	22
5.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	22
<b>5.5.1</b>	<b>Hematoxilina e Eosina (HE).....</b>	<b>23</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Citoquímica com o uso de Lectina DBA.....</b>	<b>23</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Estudo Estereológico.....</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um agente estressor é qualquer estímulo capaz de desencadear uma resposta biológica no corpo, seja ela hormonal ou neural, causando uma série de alterações na homeostasia corporal, agravando doenças ou até mesmo gerando efeitos fatais (Habib *et al.*, 2017). A exposição ao frio pode ser considerada um fator de estresse ambiental pois é um dos fatores que mais influenciam no equilíbrio homeostático (Bernuci *et al.*, 2013), impactando em outras vias metabólicas, fisiológicas e hormonais do corpo. Um exemplo disso é o aparecimento de distúrbios hormonais reprodutivos em função do uso do frio como estímulo estressor (Greenfield *et al.*, 2022).

No Brasil, é comum a presença de diferentes padrões climáticos, devido a grande extensão regional. Certas regiões, exibem um outono e inverno rigoroso, com frequente ocorrência de geadas, frentes frias e graus negativos, como é o caso da região Sul do país (Targino *et al.*, 2019). Em condições como essa, muitas mulheres em situação de rua, em especial as grávidas, enfrentam maiores desafios para manter a sua temperatura corporal, devido à falta de aquecimento, roupas e alimentos adequados.

Durante a gravidez, os efeitos estressores iniciais são transmitidos principalmente pelo sistema HPA (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) aumentando o nível de cortisol. Esse processo afeta a relação neuroendócrina materno-fetal e as respostas imunológicas podendo trazer consequências na hora do parto e danos para a mãe e o feto (Marca-Ghaemmaghami *et al.*, 2015). Um estudo recente de revisão mostra que mulheres expostas ao frio têm um risco aumentado de parto prematuro, baixo peso ao nascer e natimorto (Ruan *et al.*, 2023). Sabe-se que entre a terceira e oitava semana de gestação é onde ocorre a maioria dos defeitos congênitos e malformações, pois é nesse período que se inicia a formação dos órgãos e estruturas do embrião. O estudo de Sadler *et al.* (2017) mostrou que as duas primeiras semanas de desenvolvimento, que inclui o período de implantação, também merece atenção, já que a interrupção ou quebra de homeostasia nas vias iniciais de desenvolvimento embrionário pode levar a complicações ao longo da gravidez.

No início da gestação também acontece a migração das células Natural Killer Uterinas (uNK) para o ambiente uterino, esse recrutamento é possivelmente controlado por progesterona e estrógeno (Chantakru *et al.*, 2003). Tais células exercem um papel fundamental para o estabelecimento da gravidez. Estudos como o de Eriksson *et al.* (2004) mostram que as uNK são responsáveis pela produção de citocinas para ajudar na invasão do trofoblasto, e fatores angiogênicos para remodelação das arteríolas espiraladas uterinas. As células uNK também podem sofrer influência em seu fenótipo e função devido a estressores ambientais, impactando na saúde da gravidez (Karimi *et al.*, 2010).

Portanto, esse estudo teve como objetivo investigar como a exposição ao frio no período inicial da gestação poderia afetar a saúde gestacional, a morfologia do útero e de suas arteríolas espiraladas, bem como, a função e quantidade de células uNK.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A EXPOSIÇÃO AO FRIO E A GESTAÇÃO

A gestação é um período de grandes mudanças fisiológicas, metabólicas e comportamentais necessárias para o preparo do corpo materno a fim de receber o embrião e continuar o desenvolvimento fetal. Tais mudanças incluem alterações hormonais, como o aumento de progesterona, estrógeno, testosterona e prolactina (Peter *et al.*, 1991), essas alterações hormonais também influenciam nas adaptações fisiológicas como desenvolvimento do útero, crescimento de mamas, cessação de ovulação e menstruação (Kirkpatrick *et al.*, 1953; Napso *et al.*, 2018). Devido a essas mudanças, a mulher pode ficar mais suscetível às influências de diferentes estressores desencadeando ou agravando quadros de ansiedade (Mikolajków *et al.*, 2022) pelo aumento dos níveis de cortisol, noradrenalina e adrenalina (Cameron *et al.*, 1998; Dierckx *et al.*, 2012) além de trazer consequências na saúde fetal como a maior incidência de parto prematuro (Staneva *et al.*, 2015) aborto espontâneo, malformações ou retardo no crescimento (Mulder *et al.*, 2002; Dunkel *et al.*, 2012).

A exposição ao frio pode ser considerada um fator estressante, já que o corpo enfrenta mudanças metabólicas e fisiológicas, e por isso, acaba abandonando certas vias metabólicas, a fim de priorizar a homeostasia e a retomada da temperatura corporal (Shore *et al.*, 2013). Apesar desse processo de termogênese ser natural, a exposição a um estresse crônico em períodos mais sensíveis, como a gravidez, pode influenciar vias importantes e trazer impactos negativos nesse estágio como mostrado em diferentes estudos (Latendresse *et al.*, 2009; Matsas *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Após um evento estressor, a resposta inicial é formada pelo sistema nervoso simpático levando a liberação de adrenalina e noradrenalina, aumentando por exemplo, a pressão arterial (Charmandari *et al.*, 2005) e pelo eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) que estimula a produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) no hipotálamo, liberando o hormônio adrenocorticotropina (ACTH) na circulação. O ACTH é responsável por liberar cortisol no sangue através da glândula adrenal. O aumento do nível de cortisol faz feedback negativo para interromper a liberação de CRH em condições normais (Miller *et al.*, 2002).

Alguns estudos mostram que a exposição crônica ao estresse ou a níveis elevados de glicocorticóides podem influenciar a secreção normal de gonadotrofinas (LH e FSH) e impactar o ciclo estral devido o aumento do CRH (Rivier *et al.*, 1984; Kamel *et al.*, 1987) inibindo a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH) diminuindo a liberação de Lh e Fsh e conseqüentemente a produção de estrógeno e progesterona nos ovários (Viau *et al.*, 1991). Portanto, mudanças constantes e consistentes no eixo HPA podem influenciar o eixo HPG levando a sua inibição e diminuindo os hormônios reprodutivos circulantes (Toufexis *et al.*, 2014). A exposição ao frio pode trazer algumas conseqüências durante a gestação como o aumento de parto prematuro e natimorto (Ruan *et al.*, 2023) menor comprimento ao nascer (Bruckner *et al.*, 2014) mudanças no desenvolvimento e fertilidade da progênie na idade adulta (Piquer *et al.*, 2017) e também pode ocorrer aumento de consumo de energia o que melhora a capacidade termogênica, porém reduz a deposição de gordura no corpo (Luz *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2009).

O período peri-implantacional, estágio inicial da gravidez, começa com a chegada do blastocisto no útero e a interação com o endométrio até a sua fixação que posteriormente acarretará na formação da placenta a fim de estabelecer o meio de conexão entre a mãe e o embrião. O embrião e as células endometriais, que são regulados hormonalmente, estão suscetíveis a fatores de risco, podendo gerar futuras complicações (Glasser *et al.*, 1987). Defeitos nos estágios iniciais da gravidez, que correspondem ao período de implantação e período embrionário são perpetuados durante toda a gestação como problemas de decidualização, placentação e crescimento embrionário intra uterino, podendo gerar a não viabilidade da gestação ou partos prematuros (Cha *et al.*, 2012; Ljubic *et al.*, 2021).

Nos camundongos o período de implantação confere do 1° dia de gestação até o 6° dia de gestação e o embrionário do 6° dia de gestação até o 15° dia de gestação que compreende o período de morfogênese. O modelo escolhido para estudo foi o camundongo por apresentarem semelhança com o modelo humano, já que a placenta de ambos é do tipo hemocorial, onde o sangue materno e fetal não se misturam e isso permite uma maior semelhança na identificação de respostas metabólicas (Georgiades *et al.*, 2002; Amarante-Paffaro *et al.*, 2011,).

## 2.2 AS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS (uNK) E SUAS FUNÇÕES

Células Natural Killer Circulantes (cNK) são linfócitos responsáveis pela defesa inata do organismo, através da secreção de citocinas e quimiocinas, contra células infectadas por bactérias, vírus ou parasitas (Lodoen *et al.*, 2006; Seileit *et al.*, 2015). A capacidade citotóxica dessas células vem de seus grânulos citoplasmáticos contendo perforina capazes de lisar as células alvo (Lowin *et al.*, 1994; Ambrose *et al.*, 2020).

Em humanos, as cNK, presentes no sangue periférico, se diferenciam em dois subconjuntos classificados através da ausência ou presença da molécula CD56. As células NK CD56<sup>dim</sup> estão em maior quantidade no sangue periférico e possuem uma menor densidade dessa molécula, além de expressar o antígeno CD16, sua principal função é a citotoxicidade gerada após a estimulação dessas células com as interleucinas (IL) IL-2 e IL-15 (Caligiuri *et al.*, 2008). Em contrapartida, as cNK CD56<sup>bright</sup> apresentam uma maior quantidade dessa molécula e não possui antígeno CD16, além de produzirem uma grande quantidade de IFN- $\gamma$  quando são estimuladas por IL-2 e IL-15 porém possuem fraca atividade citolítica (Cooper *et al.*, 2001). Portanto, células CD56<sup>dim</sup> são efetivamente citotóxicas e a CD56<sup>bright</sup> regulam outras células através da secreção de citocinas (Carson *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 2001; Robertson *et al.*, 2002).

As Células Natural Killer desempenham um papel importante no útero durante a gravidez, onde um maior número de células são recrutadas devido a maior liberação de hormônios nessa região a fim de ajudar a manter a saúde e vitalidade do embrião (Zhang *et al.*, 2011). Alguns estudos Koopman *et al.* (2003); Acar *et al.* (2011) mostram que as células NK que proliferam no útero embora se assemelham com as cNK CD56<sup>bright</sup> ou cNK CD56<sup>dim</sup> formam uma linhagem única conhecida como Células Natural Killer Uterinas (uNK), apresentando grandes grânulos citoplasmáticos contendo perforinas e granzimas.

Em camundongos, as células uNK se ligam de forma específica e exclusiva na lectina DBA. Essa demarcação acontece na membrana citoplasmática, pela ligação da lectina no N-acetil D-galactosomina e nos grânulos dessas células, não sendo vista nas cNK (Paffaro *et al.*, 2003).

Apesar das uNK apresentarem grânulos, elas não possuem ação citotóxica no útero já que as células do trofoblasto expressam as moléculas não clássicas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I, como a HLA-E e HLA-G como descrito por Kopcow *et al.* (2005). Além disso, as células uNK expressam diferentes receptores em sua superfície que ajudam na inibição da toxicidade. Os principais receptores inibitórios de MHC-1, expressos por células natural killer uterinas, são os KIRs inibitórios em humanos e o Ly49A de camundongos (Sojka *et al.*, 2020).

As células uNK exercem um papel importante no aporte sanguíneo materno-fetal, aumentando sua quantidade durante a fase secretora do ciclo, atingindo seu pico no final do primeiro trimestre e diminuindo no final da gestação (Lee *et al.*, 2011), além de ser capaz de produzir citocinas e expressar moléculas como a KIR2D, que permite a interação com o HLA-C de células trofoblásticas extravilosas que formam a placenta, ajudando na sua invasão no útero (Whettlock *et al.*, 2022). As células uNK também secretam algumas citocinas como o IFN- $\gamma$  que atua na inibição da invasão do trofoblasto aumentando a sua apoptose e diminuindo o número de proteases (Lash *et al.*, 2006) e a IL-8 que pode induzir sua migração aumentando os níveis de MMP2 (metaloproteinase 2) (De oliveira *et al.*, 2010), regulando a invasão. Em humanos, quando a gestação não ocorre, estas células acabam diminuindo em número, influenciando na integridade da vascularização uterina e conseqüentemente ajudando na descamação do endométrio e menstruação (Trundley *et al.*, 2004). Um estudo de Biswas Shihhare *et al.* (2015) mostrou uma diminuição ainda mais acentuada das células uNK em mulheres que tinham sangramento menstrual intenso.

Além de regular a invasão do trofoblasto, as células uNK tem sua função principal atrelada a remodelação das arteríolas espiraladas uterinas, através da secreção de fatores angiogênicos como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PLGF (fator de crescimento placentário), Ang-1 e Ang-2 (HANNA *et al.*, 2006). O IFN- $\gamma$  secretado pelas uNK regulam o tamanho do lúmen vascular, aumentando seu diâmetro para uma maior passagem do fluxo sanguíneo e diminuindo a espessura da parede (Ashkar *et al.*, 2001; Monk *et al.*, 2005; Leonard *et al.*, 2006). Os fatores angiogênicos e as citocinas secretadas pela uNK também atuam na substituição das células musculares lisas das arteríolas por células trofoblásticas extravilosas, isso ajuda no maior influxo de sangue e diminui a resistência do vaso, facilitando o aporte sanguíneo (Robson *et al.*, 2012). Além

disso, um estudo de Wallace *et al.* (2012) mostra que tanto as uNK como as células trofoblásticas secretam muitos fatores e citocinas em comum, que servem para regular as arteríolas espiraladas, isso inclui a expressão de VEGF pelos dois tipos celulares que ajuda a interromper as camadas de células musculares lisas, ajudando na substituição do tipo celular como já mencionado acima (Lash *et al.*, 2011). Estudos anteriores demonstraram que a menor ativação ou uma ativação exacerbada do HLA e KIR, bem como, a não remodelação correta das arteríolas uterinas, estão associados com distúrbios de implantação como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal e aborto espontâneo recorrente (Hiby *et al.*, 2008; Johnsen *et al.*, 2018).

### 2.3 A EXPOSIÇÃO AO FRIO E AS CÉLULAS uNK

Algumas células do sistema imune, como as células dendríticas e as células natural killer, aumentam sua proliferação no útero durante o período de implantação (Lee *et al.*, 2011). Nos camundongos, os linfócitos começam a aparecer no útero por volta do 6° dia de gestação, período que também corresponde à implantação (Xie *et al.*, 2005). No começo as uNK são menores, não apresentando grânulos e começam a sua proliferação e distribuição pela região mesometrial do sítio de implantação que engloba o miométrio e endométrio (Paffaro *et al.*, 2003).

A proliferação das uNK no ambiente uterino, parece ser influenciada de forma direta ou indireta pelos hormônios reprodutivos. Segundo Henderson *et al.* (2003), as células uNK possuem receptores- $\beta$  para estrógeno (ER- $\beta$ ), o que explicaria uma influência direta no aumento dessas células durante a gravidez. Apesar do autor demonstrar que as células não expressam receptores para progesterona, de forma indireta, esse hormônio também influencia na proliferação das uNK através da estimulação da secreção de IL-15 (Interleucina 15) pelas células estromais (Okada *et al.*, 2000).

Como citado anteriormente, um evento estressor crônico pode diminuir os níveis hormonais de estrógeno e progesterona (Vermeulen *et al.*, 1993; Chrousos *et al.*, 1998; Valsamakis *et al.*, 2019; Morrison *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2022). Tendo em vista a inexistência de estudos relacionando a ação do frio às UNK, e como a proliferação dessas células depende desses hormônios, sugere-se que o frio possa

diminuir a proliferação da uNK impactando negativamente na sua função e atrapalhando a saúde gestacional.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Sabe-se que o estresse pode ter influência na gestação de forma geral. Poucos estudos já publicados mostram a relação entre o frio e a saúde gestacional, e a relação entre a exposição ao frio e as células Natural Killer Uterinas ainda não foi estudada. Sabendo que as células uNK tem funções importantes para manter a gestação e que estressores na gravidez podem causar complicações principalmente quando acomete o período inicial, é importante avaliar o possível efeito do frio na saúde gestacional de forma geral, já que é um fator de exposição muito comum em algumas regiões. Esse tema traz relevância tanto para a biologia reprodutiva como para o entendimento de como fatores ambientais podem influenciar a saúde.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar como a exposição ao frio no período inicial da gestação poderia afetar a saúde gestacional, a morfologia do útero e de suas arteríolas espiraladas, bem como, a função, diferenciação e quantidade de células uNK.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a aparência e a quantidade dos sítios de implantação, além do peso das fêmeas prenhes antes e depois da exposição ao frio.
- b) Avaliar a quantidade e densidade dos subtipos das Células Natural Killer nos dias 8° 11° e 15°dg nas fêmeas expostas ao frio.
- c) Investigar se o frio pode influenciar na espessura das arteríolas uterinas nos dias 8° 11° e 15°dg e relacionar isso com os demais resultados.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 35 camundongos, sendo 30 fêmeas e 5 machos da linhagem Swiss, retirados com 8 semanas de idade do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento localizado no campus sede da UNIFAL-MG, dentro de caixas de polipropileno em estantes à temperatura de  $(23\pm 2^{\circ}\text{C})$ , com água e *ração ad libitum* em um ciclo claro-escuro de 12 horas. Antes do acasalamento, todos os animais passaram por aclimação durante uma semana, e após esse período as fêmeas foram acasaladas com os machos. As fêmeas foram separadas para dar início à exposição à medida que se observava o tampão vaginal, definindo o primeiro dia de gestação (dg1). Todo o uso animal dessa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFAL-MG (protocolo:0019/23).

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para esta pesquisa, foram utilizados dois grupos experimentais: o grupo de exposição ao frio (G2) e o grupo controle (GC), cada um contendo 15 fêmeas. As fêmeas do grupo G2, foram expostas a uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em câmara fria durante 8 horas/dia, seguindo uma adaptação do protocolo de Piquer *et al.* (2017) ainda dentro de caixas de polipropileno contendo maravalha, comida e bebida *ad libitum* desde o 1°dg até a manhã do 8°dg, a fim de avaliar a influência do frio no período de implantação. Os 15 animais foram subdivididos em 3 grupos de 5, onde sofreram eutanásia no 8°, 11° e 15°dg. O grupo controle não sofreu exposição ao frio e também foi subdividido em 3 grupos de 5 animais e eutanasiados no 8°, 11° e 15°dg para comparação com o grupo tratado.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA)

de duas vias seguida do teste de Sidak, para análises de comparações múltiplas quando duas variáveis estavam presentes (tratamento com frio e dias de gestação). Para as análises com apenas uma variável (tratamento com frio) foi utilizado o teste t não-pareado para dados paramétricos e teste de Mann Whitney para dados não-paramétricos. Todas as análises foram feitas por meio do software GraphPad Prism 9.0. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. Os testes referentes a cada análise encontram-se indicados nas legendas das imagens.

#### 5.4 ANÁLISE DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E PESO (g) DAS FÊMEAS

Os sítios de implantação (SI) das fêmeas foram analisados e quantificados, a fim de se observar qualquer alteração como hemorragias e/ou possíveis perdas gestacionais, comparando a quantidade de SI entre o grupo controle e o grupo tratado. Além disso, todas as fêmeas, destinadas à exposição ao frio, foram pesadas antes e depois da exposição na câmara fria.

#### 5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

No dia definido para ocorrer a eutanásia, a fêmea foi perfundida com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M pH7,4 com inalação de isoflurano 2% para efeito anestésico. Os cornos uterinos do 8° e 11°dg foram coletados e os SI dissecados, bem como a placenta do 15°dg, para serem incluídos em parafina. Para esse procedimento, primeiro ocorreu a desidratação dos cortes em diferentes concentrações de etanol por 30 minutos (70%, 90%, 95%, álcool absoluto 1, 2 e 3) e a sua diafanização com xilol 1 e 2 por 15 minutos cada. Os cortes incluídos na parafina, foram seccionados a 6µm de espessura sob lâminas histológicas revestidas com poli-L-lisina a 10%. As lâminas continham 3 cortes do mesmo sítio de implantação e foram utilizadas para avaliação histológica através da coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e histoquímica com lectina DBA.

### **5.5.1 Hematoxilina e Eosina (HE)**

Para essa técnica foram utilizados 3 cortes de 3 SI escolhidos de forma aleatória de cada um dos animais, a fim de se avaliar a morfometria das arteríolas espiraladas uterinas. Para isso, as lâminas passaram por desparafinização em xilol 1 e 2 durante 20 minutos cada, depois foi hidratada com diferentes concentrações de etanol (álcool absoluto 1, 2 e 3, 95%, 90% e 70%) e água durante 5 minutos em cada. Para a coloração, foi utilizada a Hematoxilina de Harrys, previamente filtrada, por 45 segundos. Depois as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e deixadas 30 segundos na Eosina. Após a coloração, as lâminas são desidratadas com concentrações crescentes de Etanol (70%, 90%, 95%, absoluto 1, 2 e 3) e diafanizadas no xilol com posterior montagem utilizando Entellan. Essas lâminas foram analisadas em microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) e software de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan)

### **5.5.2 Citoquímica com o uso de Lectina DBA**

A citoquímica com lectina DBA foi utilizada para identificação das células uNK DBA+. Para esse procedimento, as lâminas passaram por uma bateria de desparafinização, ficando 20 minutos no xilol 1 e no xilol 2, e hidratação em concentrações decrescentes de etanol e água durante 5 minutos em cada (álcool absoluto 1, 2 e 3, 95%, 90% e 70%). Os cortes foram tamponados com PBS 0,05 M pH 7.4, lavados e depois incubados com H2O2 1% (peróxido de hidrogênio) em PBS 0,05 M pH 7.4 por 30 minutos. Cada corte foi lavado 2 vezes com o auxílio de uma bomba de sucção e uma pipeta de pasteur com PBS 0,05 M pH 7.4. Posteriormente, se deu a incubação com BSA 1% (Bovine Serum Albumin – Sigma, St Louis, USA) em PBS por 30 minutos. A solução de BSA/PBS foi então sugada pela bomba de sucção e feita a incubação da Lectina DBA-Biotina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:300 em PBS, onde foi deixada em câmara úmida durante 12 horas a 4°C.

Após o overnight, os cortes foram lavados 5 vezes com PBS e incubados com estreptavidina/peroxidase (Chemicon International, Temecula, CA, USA) em PBS durante 1 hora, lavados mais 5 vezes e revelados com o uso de uma solução trabalho de DAB (diaminobenzidina - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e peróxido de hidrogênio 0,1% em PBS. Após o excesso de solução ser removido com água

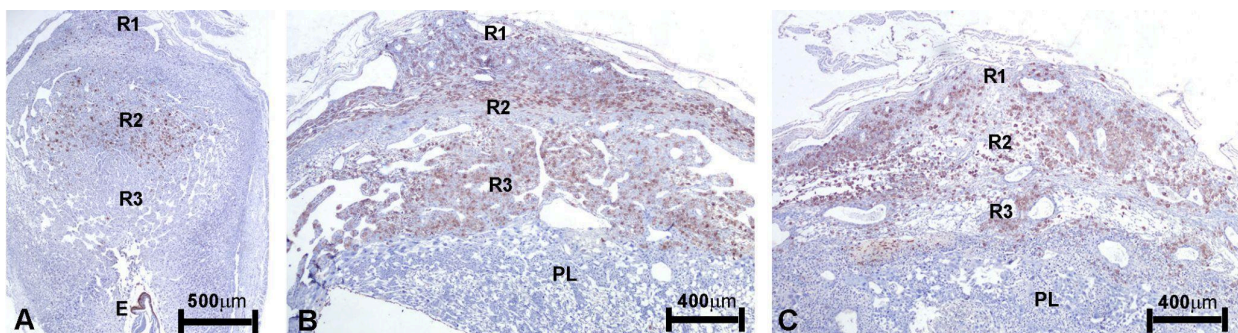
destilada, os cortes são corados com Hematoxilina de Harris, desidratada em uma solução crescente (70%, 90%, 95%, álcool absoluto 1, 2 e 3) de etanol por 5 minutos em cada e no xilol, com posterior montagem da lâmina com Entellan.

### 5.5.3 Estudo Estereológico

Esse estudo foi realizado com o intuito de analisar a densidade dos 4 subtipos de células uNK DBA+ presentes nas 3 regiões dos SI (Figura 1) contemplando uma área de  $200\mu\text{m}^2$  como descrito em (Paffaro *et al.*, 2003), essa área é delimitada por um teste quadrático, com duas linhas de exclusão e apenas as células com núcleos visíveis foram contadas.

A análise foi realizada utilizando 3 cortes de 3 sítios de implantação diferentes escolhidos aleatoriamente de cada um dos animais. Essas lâminas foram analisadas em microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) e software de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

Figura 1 - Regiões do Sítio de Implantação pela citoquímica com lectina DBA



Fonte: da autora (2024, p. 24)

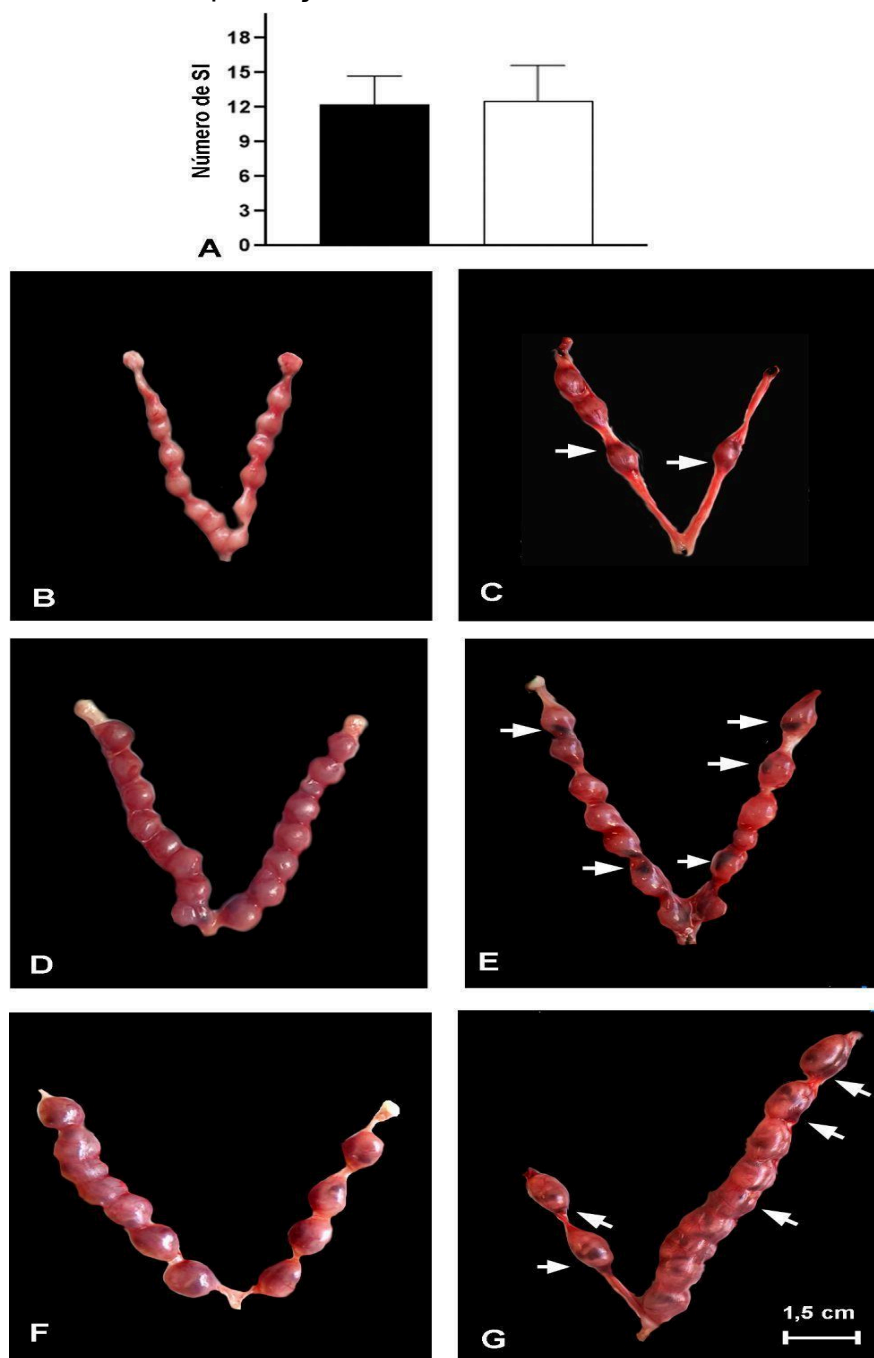
Legenda: Em A: Sítio de implantação de 8°dg onde a região 1 (R1) representa o miométrio, a 2 (R2) a região endometrial intermediária e a região 3 (R3) o endométrio decidualizado próximo ao embrião (E), B: Sítio de implantação de 11°dg onde a região 1 (R1) representa o miométrio, a 2 (R2) a região endometrial intermediária e a região 3 (R3) o endométrio decidualizado próximo a placenta (PL), C: Sítio de implantação de 15°dg onde a região 1 (R1) representa o miométrio, a 2 (R2) a região endometrial intermediária e a região 3 (R3) o endométrio decidualizado próximo a placenta (PL).

## 6 RESULTADOS

Quanto ao número de sítios de implantação, não se observou nenhuma mudança significativa entre o grupo exposto ao frio e o grupo controle (Figura 2 A). No entanto, foram observadas áreas hemorrágicas nos grupos de 8°dg, 11°dg e 15°dg expostos ao frio como observado na Figura 2 C, E, G, respectivamente. No 8°dg, apenas 1 animal submetido ao frio apresentou hemorragia, além de serem observados apenas 4 sítios de implantação embrionária nesse animal. No 11°dg existiam focos hemorrágicos em todos os animais expostos em relação ao grupo controle. Por fim, no 15°dg também foram observados focos hemorrágicos em alguns animais. Em cortes histológicos de alguns sítios de implantação de animais submetidos ao frio no 11°dg, corados por HE, foi possível observar extensas áreas hemorrágicas na região de implantação embrionária (figura 3B). Cortes histológicos de certos sítios de implantação de animais submetidos ao frio e coletados no 15° dg também apresentavam extensas áreas hemorrágicas na região mesometrial (Figura 3C, 3D) acompanhada de hipocelularidade (figura 3E), onde as uNK se localizavam em meio a essas regiões (figura 3F).

Nossas análises revelaram um aumento significativo do peso dos animais expostos ao frio do 1° ao 7° dg (30,1g e 33,2g,  $p=0,0005$ ). Nota-se que após cada exposição noturna ao frio, foram observadas pequenas quedas no peso dos animais, seguidas de pequenos aumentos no peso durante o dia. No entanto, essa aparente diminuição diária no peso dos animais causada pela exposição ao frio não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,8127$ ), (Figura 4).

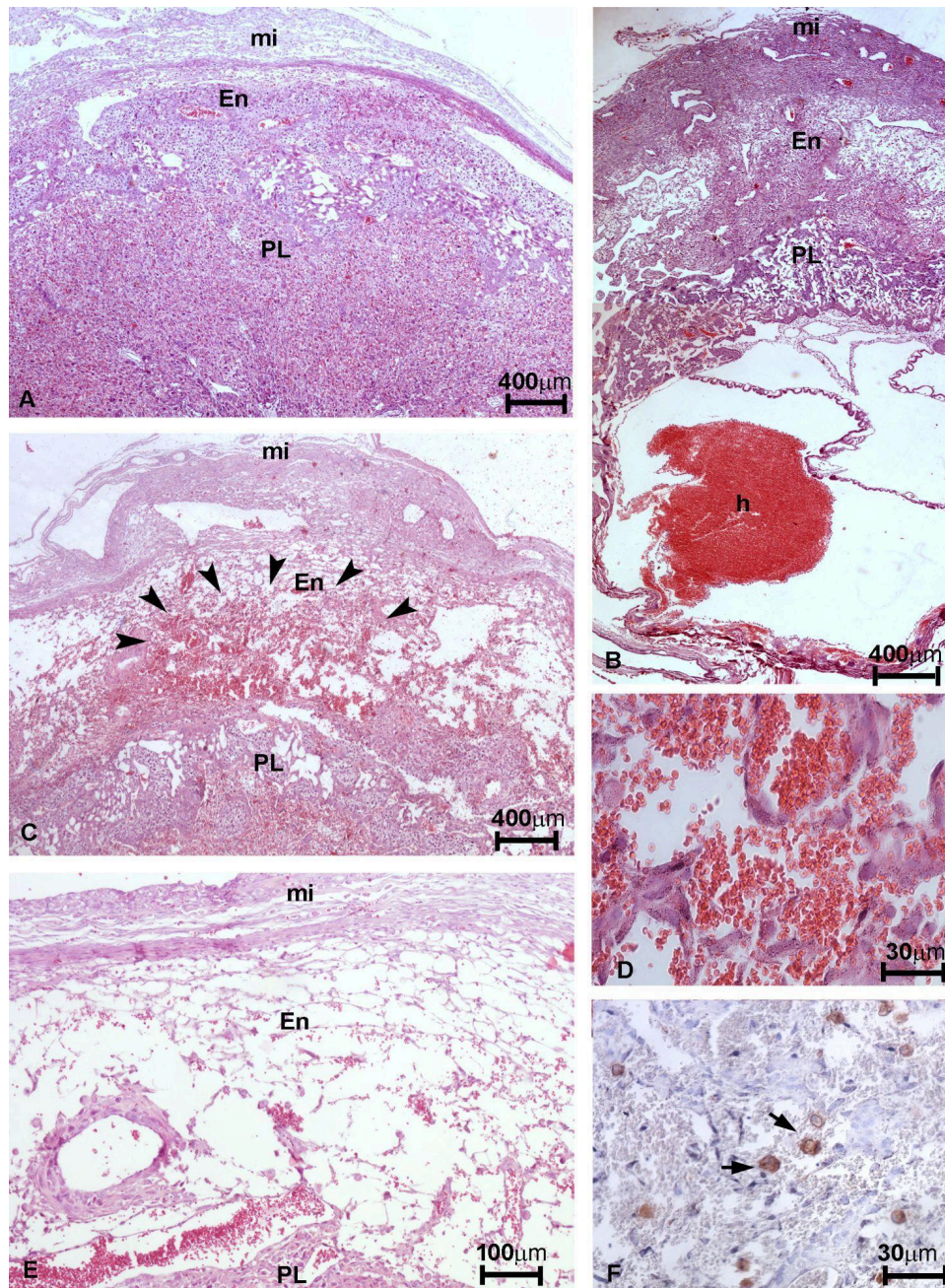
Figura 2 - Número e áreas hemorrágicas dos sítios de implantação



Fonte: da autora (2024, p. 26)

Legenda: Em A: Total de sítios de implantação de todos os animais expostos ao frio (em branco) e do grupo controle (em preto), análise estatística utilizada foi o teste T pareado. De B a G: Exemplos de úteros prenhes do 8°, 11° e 15° dg. B: sítios de implantação de um animal do GC no 8°dg, C: Sítio de implantação de um animal do G2 de 8°dg com pontos hemorrágicos (setas brancas), D: Sítio de implantação de um animal do GC de 11°dg, E: Sítio de implantação de um animal do G2 de 11°dg, com pontos hemorrágicos (setas brancas), F: Sítio de implantação de um animal do GC de 15°dg, G: Sítio de implantação de um animal do G2 de 15°dg com pontos hemorrágicos (setas brancas).

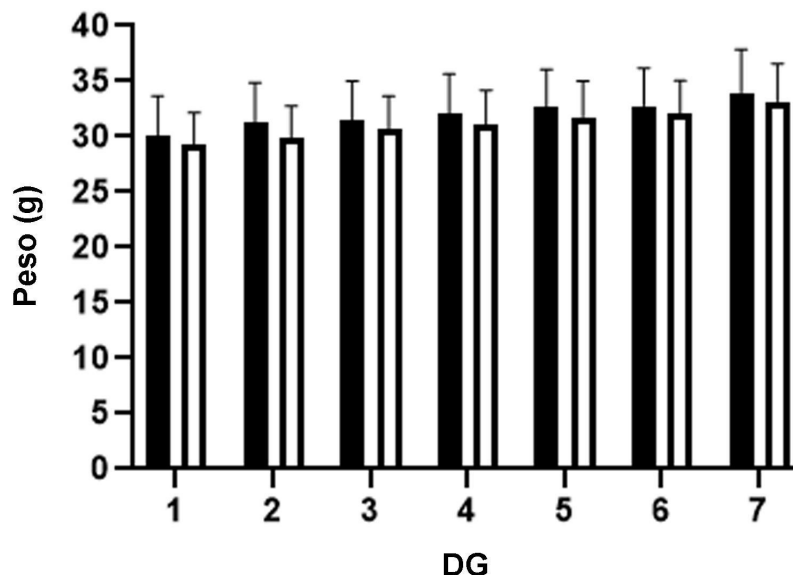
Figura 3 - Áreas hemorrágicas em lâminas coradas com Eosina Hematoxilina de animais do 11°dg e 15°dg (G2)



Fonte: da autora (2024, p. 27).

Legenda: Em A: SI de um animal controle (GC) de 15°dg, na imagem é possível visualizar o miométrio (mi) o endométrio (En) que corresponde a região 2 e 3 e o início da formação da placenta (PL), B: SI de um animal exposto ao frio (G2) de 11°dg com área hemorrágica (h) na região de desenvolvimento embrionário, C: SI de um animal exposto ao frio (G2) de 15°dg com área hemorrágica no endométrio (En) apontada pelas setas pretas, D: Aumento de 40x em área hemorrágica em um animal de 15°dg (G2), onde são observados muitos eritrócitos, E: SI de um animal exposto ao frio (G2) de 15°dg mostrando extensa área hipocelular e hemorrágica, F: Detalhe de região mesométrica de SI de camundongo exposto ao frio e do 15° dg (G2) submetido a citotóxica de lectina DBA mostrando a presença de células uNK DBA+ (setas pretas) em região hemorrágica equivalente à observada na figura 3C.

Figura 4. Peso dos animais em grama (g) antes e depois da exposição ao frio do 1° ao 7° dia de gestação



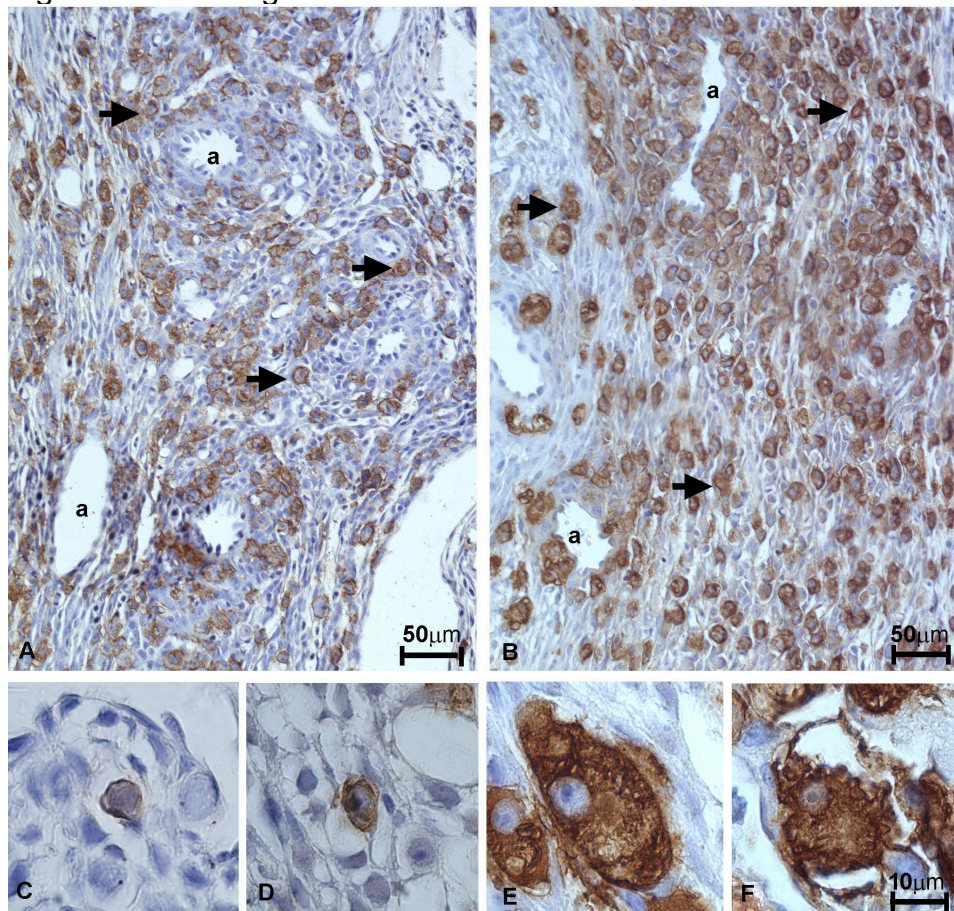
Fonte: da autora (2024, p. 28)

Legenda: Em preto, é mostrada a média de peso de todos os animais do grupo G2 antes da exposição ao frio e em branco a média dos pesos de todos os animais do grupo G2 depois da exposição ao frio. Nota-se que as barras do gráfico seguem um padrão, onde o peso é sempre recuperado no dia seguinte da exposição ao frio e aumenta ao longo dos dias. A análise estatística realizada foi o teste T não pareado.

Em relação a morfologia das células Natural Killer Uterina, foi observado, tanto no grupo controle como no grupo exposto, a marcação das células uNK DBA+ (Figura 5A e B), além dos 4 subtipos de células descritos por Paffaro Jr *et al.* (2003). O subtipo 1 se caracteriza por um núcleo bem evidente com heterocromatina predominante, não contém grânulos e são pequenas em diâmetro (Figura 5 C). O subtipo 2 já é um pouco maior e contém alguns grânulos em seu citoplasma (Figura 5 D). O subtipo 3 possui um diâmetro grande e muitos grânulos citoplasmáticos (Figura 5 E). O subtipo 4 se destaca por possuir grânulos e vacúolos em seu citoplasma (Figura 5 F). O número total de uNK não foi estatisticamente alterado em nenhum dos dias de gestação (8dg: GC=16,9 e G2=17,1,  $p=0,99$ ; 11°dg: GC=56,1 e G2=47,2,  $p=0,726$  ; 15°dg: G2=38 e GC= 32,4,  $p=0,524$  ) (Figura 7) . Quanto a quantidade dos subtipos dessas células, também não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) entre o grupo exposto ao frio e o

grupo controle em nenhum dos subtipos, nenhuma das regiões e em nenhum dos três dias de gestação estudado (8<sup>o</sup>dg, 11<sup>o</sup>dg e 15<sup>o</sup>dg) (Figura 6), os subtipos mais imaturos 1 e 2 aparecem com maior frequência na região 2 tanto no grupo controle como no grupo exposto (Figura 6 B e E). A incidência de células uNK do subtipo 3 (tipo maduro) e 4 (tipo senescente) era maior no 11<sup>o</sup>dg (Figura 6 G, H e I) e 15<sup>o</sup>dg (Figura 6 J, K, L), tanto no grupo controle como no grupo exposto ao frio, reforçando que o frio não foi capaz de modificar a incidência e diferenciação das uNK.

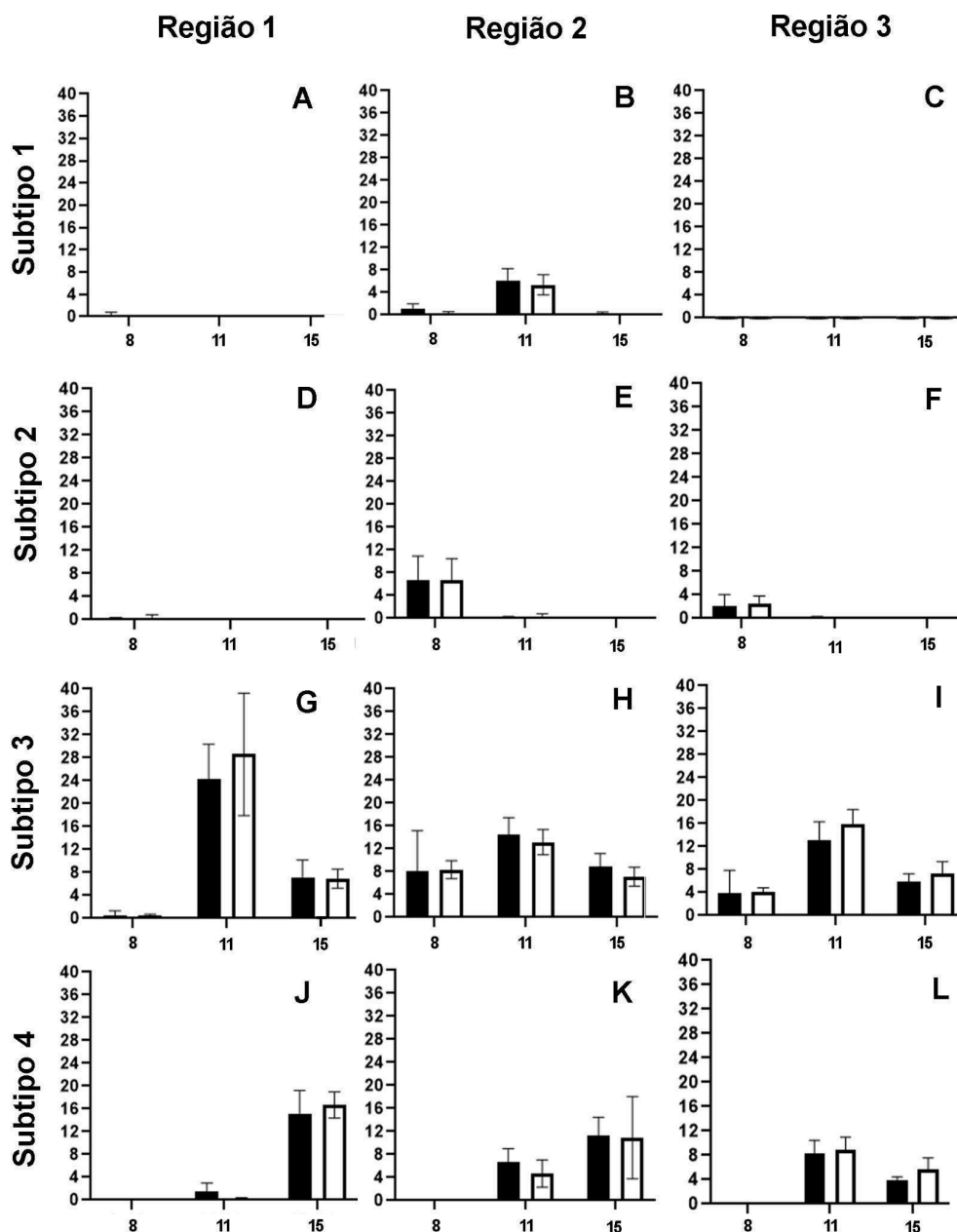
Figura 5 - Morfologia das Células uNK DBA+



Fonte: da autora (2024, p. 29)

Legenda: Em A: SI de 11<sup>o</sup>dg (GC) mostra células uNK reativas para lectina DBA (setas pretas) e arteríolas espiraladas uterinas (a), B: SI de 11<sup>o</sup>dg (G2) mostrando células uNK DBA reativas (setas pretas), C: Subtipo 1 de uNK, D: Subtipo 2 de uNK, E: Subtipo 3 de uNK, F: Subtipo 4 de uNK.

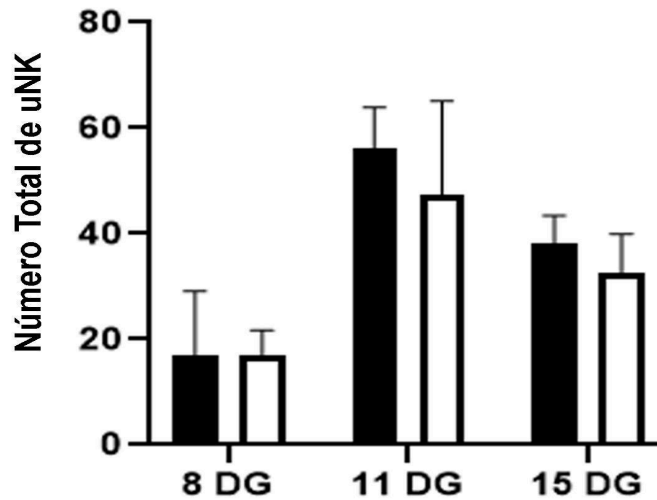
Figura 6 - Número de células uNK dos subtipos 1, 2, 3 e 4 nas regiões 1, 2, 3 e 3 nos sítios de implantação de 8<sup>o</sup>dg, 11<sup>o</sup>dg e 15<sup>o</sup>dg



Fonte: da autora (2024, p. 30)

Legenda: Animais controle (GC) (barras pretas). Animais submetidos ao frio (G2) (Barras brancas). Testes estatísticos utilizados foram ANOVA de 2 vias e teste Sidak para comparações múltiplas.

Figura 7 - Número total das Células uNK nos 3 dias de gestação



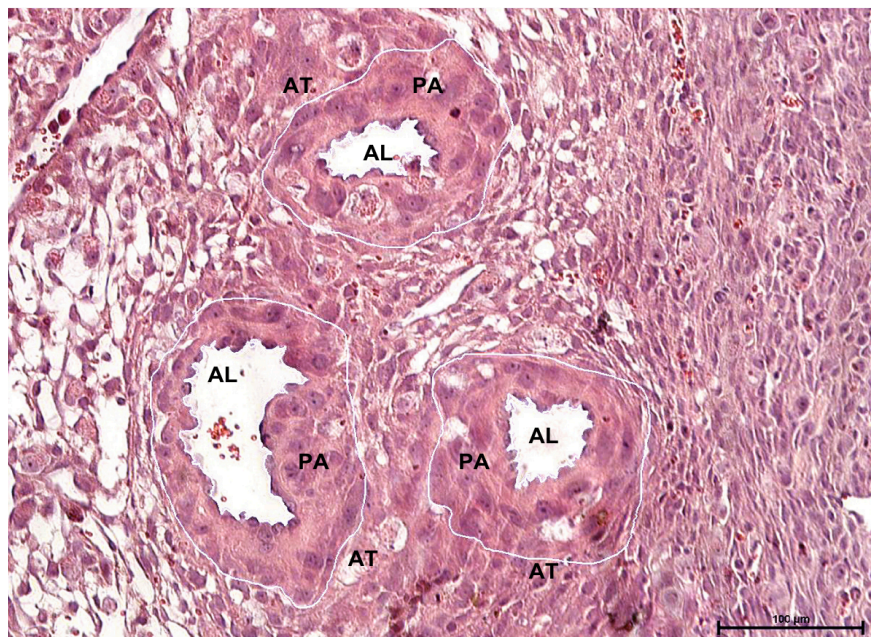
Fonte: da autora (2024, p. 31)

Legenda: Em preto tem-se a média de todas as células uNK quantificadas dos grupos 8ºdg, 11ºdg e 15ºdg, envolvendo todas as regiões e todos os animais do grupo controle (GC). Em branco, a média de todas as células uNK quantificadas dos grupos 8ºdg, 11ºdg e 15ºdg, envolvendo todas as regiões e todos os animais expostos ao frio. Testes estatísticos utilizados foram ANOVA de 2 vias e teste Sidak para comparações múltiplas.

Para a análise morfométrica das arteríolas espiraladas uterinas, mensurou-se a espessura da parede arterial (PA), para isso, foi realizado a diferença entre a Área Total (AT) e a Área Luminal (AL), onde a área total representa a medida externa da parede do vaso mais a região luminal (Figura 8).

Como observado na Figura 9 E, a espessura da parede arterial no grupo de 8ºdg exposto ao frio foi estatisticamente menor ( $3135 \text{ um}^2$ ) do que o grupo controle ( $3403 \text{ um}^2$  e  $p=0.047$ ). Entretanto, no grupo de 11ºdg não foi encontrada uma diferença significativa ( $p=0,878$ ) quando comparado ao grupo controle ( $14460 \text{ um}^2$  X  $14289 \text{ um}^2$ ). O mesmo aconteceu com o grupo de 15ºdg ( $27491 \text{ um}^2$ ), não apresentando uma diferença estatística ( $p=0,901$ ) em comparação ao seu controle ( $24165 \text{ um}^2$ ). Na Figura 9 A e C é possível observar a maior espessura na arteríola espiralada uterina no SI de 8ºdg do grupo controle (GC), enquanto que na Figura 9 B e D observa-se a diminuição dessas arteríolas em um animal exposto ao frio de 8ºd

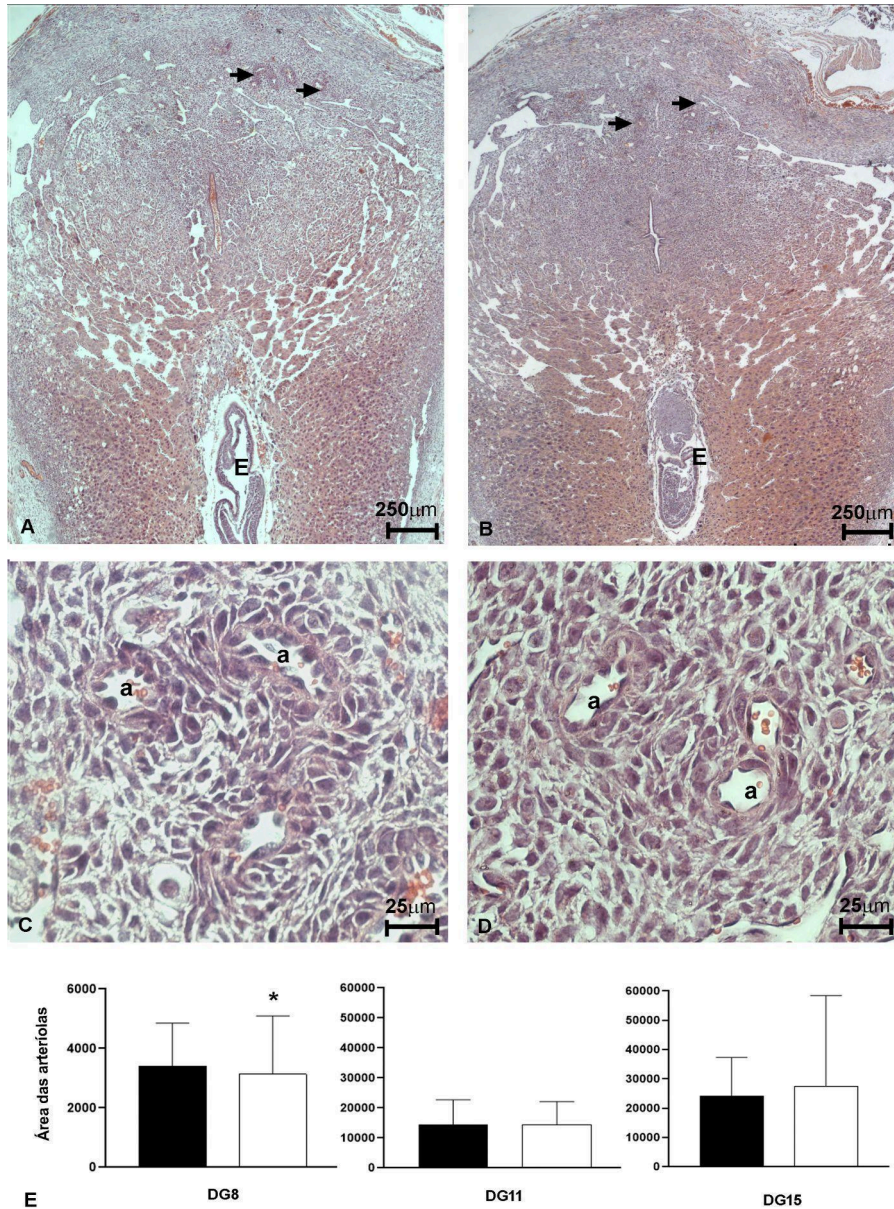
Figura 8 - Corte histológico de Sítio de implantação do 11º dg de animais do grupo G2



Fonte: da autora (2024, p. 32)

Legenda: Demonstração de como foi medida a espessura das paredes das arteríolas uterinas, o contorno em branco na área externa da parede é considerado a área total (AT), o contorno em branco no lúmen da arteríola é considerado a área luminal (AL). A diferença entre essas duas medidas mostra a espessura da parede das arteríolas (PA).

Figura 9 - Cortes histológicos de sítios de implantação de 8° dg submetidos à coloração de HE



Fonte: da autora (2024, p. 33)

Legenda: Em A: SI de 8°dg de um animal controle (GC), B: SI de 8°dg de um animal exposto ao frio (G2). Arteríolas (setas). C: Detalhe de corte histológico de SI do controle de 8°dg mostrando as arteríolas (a) D: Detalhe de corte histológico de SI do grupo G2 de 8°dg mostrando as arteríolas (a), E: Morfometria da parede das arteríolas espiraladas uterinas no 8°dg 11°dg e 15°dg em animais controle (barras pretas) e submetidos ao frio (barras brancas). O teste estatístico utilizado foi o teste de Mann Whitney.

## 7 DISCUSSÃO

Apesar de não termos encontrado perda de peso estatisticamente significativa em animais submetidos ao frio do 1° ao 7° dg, observamos que esses animais perdiam peso após cada exposição ao frio e que esse peso era posteriormente recuperado durante o dia enquanto os mesmos estavam livres da influência do estresse. O estudo de Ravussin *et al.*, (2014) demonstrou que a exposição ao frio aumenta o gasto energético através da ativação da gordura marrom, a fim de estimular a produção de calor pelo corpo (termogênese), o que influencia na perda de peso. A posterior retomada de peso dos animais durante o dia pode ter ocorrido pela necessidade de uma maior ingestão de alimento para recuperar o gasto energético, como já foi demonstrado em outro estudo (Gong *et al.*, 2023).

Em relação às células uNK, seus 4 subtipos, apesar de estarem presentes no grupo exposto ao frio, não foram alterados como observado em outros modelos. No estudo de Zavan *et al.* (2012) sobre o efeito da esplenectomia nas células Natural Killer Uterinas, observou-se um atraso no recrutamento dessas células, onde o subtipo 1 estava em menor número nas regiões 1 e 2 quando comparado ao grupo controle, o subtipo 2 se manteve alto no 12°dg em comparação ao controle, e o subtipo 3 também aumenta no 12°dg, indicando um atraso na proliferação e diferenciação. Além disso, em nossos achados, a distribuição e a diferenciação das células também não sofreu alteração significativa como é visto em estudos envolvendo outros estressores. Em Zavan *et al.* (2016) a exposição dos camundongos ao LPS, desencadeou uma proliferação de células uNK imaturas e diminuiu os subtipos maduros além de mostrar o aparecimento de um quinto subtipo celular (DBA<sup>low</sup>uNK) que apresentavam baixa reatividade à lectina DBA na superfície e ausência de DBA nos grânulos. No modelo de Évila *et al.* (2024) sobre a influência de diferentes padrões alimentares nas uNK, observou-se um aumento no número de Células (DBA<sup>low</sup> low uNK) nas dietas com alto teor de carboidratos e gordura e menos células uNK dos subtipos II e III na dieta com alto teor de carboidrato, onde ambos os grupos demonstraram desencadear inflamação. Com isso, nota-se que o frio não apresenta o mesmo padrão dos outros estressores já testados na literatura, e isso revela que esses outros estressores parecem ser mais contundentes que o frio, agindo em vias que acabaram ativando as células uNK. A mudança de

temperatura parece ser mais natural, diferente das inflamações (causada pela dieta) ou a mimetização de processos inflamatórios causado pelo LPS ou ainda a direta interferência na migração dessas células como visto no estudo da esplenectomia. Sendo assim, para nossa surpresa, o estresse induzido pelo frio não foi capaz de gerar alterações na diferenciação, distribuição, maturação e morfologia das uNK como era esperado.

Apesar do frio não ter alterado a incidência e diferenciação das uNK, em nossos estudos a espessura das arteríolas espiraladas de sítios de implantação de 8° dg de animais submetidos ao frio estavam mais delgadas que nos animais controle. No entanto, posteriormente em animais do 11° e 15° dg submetidos ao frio as arteríolas espiraladas não se apresentavam alteradas. Esses resultados sugerem que os animais submetidos ao frio do 1° ao 7° dg tiveram suas arteríolas modificadas durante a exposição ao frio como observado no 8° dg, no entanto, cessado o estímulo estressor essas arteríolas puderam se recuperar mostrando diâmetros normais nos dias de gestação subsequentes (11° e 15° dg) comparados aos respectivos controles. Zhang *et al.* (2018), em seus estudos com camundongos prenhes tratados com nanopartículas de dióxido de titânio, sugeriram que a redução no diâmetro das arteríolas destes animais, pode ter acontecido pela diminuição em número das células uNK. Na verdade, o efeito na angiogênese e modificação vascular das células uNK durante a gestação já foi amplamente descrito na literatura, tanto em camundongos (Chantakru *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2014; Baltayeva, *et al.*, 2020), quanto em seres humanos (Lash *et al.*, 2006; Robson *et al.*, 2012; Almasry *et al.*, 2015). No entanto, em nossos estudos utilizando o estímulo da baixa temperatura durante o início da gestação, essa relação das uNK com as arteríolas espiraladas não foi confirmada, o que sugere que o adelgaçamento destas artérias observado no 8° dg não está relacionado a ativação das uNK, mas sim à outras vias relacionadas a exposição deste estímulo estressor que podem ter levado a vasoconstrição. A vasoconstrição arterial é um fenômeno que pode ocorrer após a exposição ao frio e isso se deve principalmente à regulação de efetores neurais do sistema nervoso simpático como a norepinefrina, responsável por contrair a musculatura lisa presente na parede arterial a fim de preservar o calor corporal (Zhang *et al.*, 2021).

As células musculares lisas presentes no útero, também são inervadas pelo sistema nervoso simpático, e a sua estimulação pelo frio, vai culminar na contração

uterina e na regulação do fluxo sanguíneo como consequência (Malvasi *et al.*, 2024). Outro fator que atua na regulação da vasoconstrição é a endotelina, um vasoconstritor secretado pelas células endoteliais dos vasos. Um estudo de Wang *et al.* (2020) mostrou que o estresse gerado pelo frio, aumenta a produção de endotelina o que culmina em uma maior contração das células musculares lisas.

Além disso, apesar de o número de sítios de implantação (SI) não ter diminuído em número nos dias de gestação analisados em nosso estudo e quando comparado ao grupo controle, foi possível encontrar macroscopicamente e microscopicamente SI com extensas áreas hemorrágicas, as quais não foram observadas em controles. Nesse sentido, a ocorrência de hemorragias após exposição ao frio pode estar relacionada ao aumento da pressão arterial, como já descrito na literatura (Pan *et al.*, 2023). Esses autores observaram adicionalmente uma diminuição no peso da placenta e dos fetos, além de modificações no rim de camundongos prenhes expostos ao frio.

Portanto, é razoável supor que, também em nossos estudos, o frio tenha provocado aumento da pressão arterial, concomitante a vasoconstrição das arteríolas espiraladas, causando as áreas hemorrágicas e hipocelulares observadas no endométrio da região mesometrial destes animais. Esses fatores podem limitar o aporte sanguíneo para o feto, o que pode prejudicar a saúde gestacional através da diminuição do crescimento do feto e da placenta (Morton *et al.*, 2017), o que poderia ser confirmado por meio de estudos adicionais da prenhez a termo e da qualidade da prole de camundongos submetidos ao frio no início da gestação.

## 8 CONCLUSÃO

Diferente do observado em modelos utilizando agentes infecciosos (LPS), inflamatórios (Ração Hiperlipídica) e agentes que influenciam de forma direta a migração das células (esplenectomia), o frio durante o início da gestação não alterou a distribuição e diferenciação das uNK de camundongos. No entanto, o frio pode alterar as arteríolas espiraladas uterinas e causar hemorragias que podem diminuir a viabilidade gestacional via caminhos diferentes daqueles que utilizam a ativação das uNK e que podem ser confirmados com estudos adicionais.

## REFERÊNCIAS

- ACAR, N.; USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: A review. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 2, p. 82–91, 2011.
- ALMASRY, S. M. et al. Ultrastructure alteration of decidual natural killer cells in women with unexplained recurrent miscarriage: a possible association with impaired decidual vascular remodeling. **Journal of Molecular Histology**, v. 46, n. 1, p. 67–78, 2015.
- AMARANTE-PAFFARO, A. M. et al. Localization of cathepsins D and B at the maternal-fetal interface and the invasiveness of the trophoblast during the postimplantation period in the mouse. **Cells Tissues Organs**, v. 193, n. 6, p. 417-425, 2011.
- AMBROSE, A. R. et al. Synaptic secretion from human natural killer cells is diverse and includes supramolecular attack particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 38, p. 23717–23720, 2020.
- ASHKAR, A. A.; CROY, B. A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 235–241, 2001.
- BALTAYEVA, J. et al. Obesogenic diet exposure alters uterine natural killer cell biology and impairs vasculature remodeling in mice. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 1, p. 63–75, 2020.
- BERNUCCI, M. P. et al. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats. **Journal of Neuroendocrinology, Oxford**, v. 25, n. 1, p. 23-33, 2013.
- BISWAS SHIVHARE, S. et al. Menstrual cycle distribution of uterine natural killer cells is altered in heavy menstrual bleeding. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 112, p. 88–94, 2015.
- BRUCKNER, T. A.; MODIN, B.; VÅGERÖ, D. Cold ambient temperature in utero and birth outcomes in Uppsala, Sweden, 1915-1929. **Annals of Epidemiology**, v. 24, n. 2, p. 116–121, 2014.
- CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461–469, 2008.
- CAMERON, O. G.; NESSE, R. M. Systemic hormonal and physiological abnormalities in anxiety disorders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 13, n. 4, p. 287–307, 1988.
- CARSON, W. E. et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. **J. Exp. Med.** 180, 1395–1403, 1994.

CHA, J.; SUN, X.; DEY, S. K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 12, p. 1754–1767, 2012.

CHANTAKRU, S. et al. Coordinate Regulation of Lymphocyte-Endothelial Interactions by Pregnancy-Associated Hormones. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 4011–4019, 2003.

CHARMANDARI, E.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. Endocrinology of the stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 259–284, 2005.

CHROUSOS, G.P., Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. **Ann Intern Med**; v. 129, p. 229–240, 1998.

COOPER, M. A. et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3146–3151, 2001.

COOPER, M. A. et al. The biology of human natural killer cell subsets. **Trends Immunol.** 22, 633–640. 15, 2001

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Role of Interleukin 8 in Uterine Natural Killer Cell Regulation of Extravillous Trophoblast Cell Invasion. **Placenta**, v. 31, n. 7, p. 595–601, 2010.

DIERCKX, B. et al. Persistence of anxiety disorders and concomitant changes in cortisol. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, n. 6, p. 635–641, 2012.

DUNKEL SCHETTER, C.; TANNER, L. Anxiety, depression and stress in pregnancy: Implications for mothers, children, research, and practice. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 141–148, 2012.

ERIKSSON, M. et al. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF- $\beta$ . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 3, p. 667–675, 2004.

EVILA, S. et al. The role of dietary patterns in the polarization of angiogenic uterine Natural Killer cells during murine pregnancy. **bioRxiv**, 2024.

GEORGIADES, Pantelis; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta**, v. 23, n. 1, p. 3-19, 2002.

GLASSER, S. R. et al. Biological markers during early pregnancy: trophoblastic signals of the peri-implantation period. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 129–147, 1987.

GONG, L. et al. Assessment of cold exposure-induced metabolic changes in mice using untargeted metabolomics. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, n. August, p. 1–18, 2023.

- GREENFIELD, A. M.; CHARKOUDIAN, N.; ALBA, B. K. Influences of ovarian hormones on physiological responses to cold in women. **Temperature**, v. 9, n. 1, p. 23–45, 2022.
- HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. **Nat Med, Jerusalem**, v. 12, p. 1065–1074, 2006.
- HENDERSON, T. A. et al. Steroid receptor expression in uterine Natural Killer cells. **J Clin Endocrinol Metab**, Edinburgh, v. 88, p. 440–449, 2003.
- HIBY, S. E. et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 4, p. 972–976, 2008.
- JOHNSEN, G. M. et al. The combination of maternal KIR-B and fetal HLA-C2 is associated with decidual basalis acute atherosclerosis in pregnancies with preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 129, n. April, p. 23–29, 2018.
- KAMEL, F.; KUBAJAK, C. L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: Interaction with gonadal steroids and mechanism of action. **Endocrinology**, v. 121, n. 2, p. 561–568, 1987.
- KARIMI, K.; ARCK, P. C. Natural Killer cells: Keepers of pregnancy in the turnstile of the environment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 3, p. 339–347, 2010.
- KIRKPATRICK, H., & Robertson, J. Hormonal Changes in Pregnancy. **International Journal of Clinical Practice**, v. 7, 1953.
- KOOPMAN, L. A. et al. Human decidual Natural Killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med, Cambridge**, v. 198, p. 1201–1212, 2003.
- KOPCOW, H. D. et al. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **Proc Natl Acad Sci USA, Cambridge**, v. 102, p. 15563–15568, 2005.
- LASH, G. E. et al. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: Effect on cytokine and angiogenic growth factor production. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2289–2295, 2011.
- LASH, G. E. et al. Interferon- $\gamma$  inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2512–2518, 2006.
- LATENDRESSE, G. The Interaction Between Chronic Stress and Pregnancy: Preterm Birth from A Biobehavioral Perspective. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 54, n. 1, p. 8–17, 2009.
- LEE, J. Y.; LEE, M.; LEE, S. K. Role of endometrial immune cells in implantation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 38, n. 3, p. 119–125, 2011.

LEONARD, S. et al. Mechanisms Regulating Immune Cell Contributions to Spiral Artery Modification - Facts and Hypotheses - A Review. **Placenta**, v. 27, n. SUPPL., p. 40–46, 2006.

LIMA P. D, et al. Ly49 receptors activate angiogenic mouse DBA<sup>+</sup> uterine natural killer cells. **Cellula and Molecular Immunology**. 2014 v. 11. n3, p467-476. 2014.  
LJUBIĆ, A.; LJUBIĆ, D.; BOŽANOVIĆ, T. Implantation and the fetal health. **Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 15, n. 1, p. 81–86, 2021.

LODOEN, M. B. et al. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 391–398, 2006.

LOWIN, B. et al. A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11571–11575, 1994.

LUZ, J.; GRIGGIO, M. A. Energy balance of pregnant rats in a cold environment. **Journal of Thermal Biology**, v. 17, n. 4–5, p. 235–239, 1992.

MALVASI, A. et al. Localization of Catecholaminergic Neurofibers in Pregnant Cervix as a Possible Myometrial Pacemaker. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, 2024.

Marca-Ghaemmaghami, P., & Ehlert, U. Stress During Pregnancy Experienced Stress, Stress Hormones, and Protective Factors. **European Psychologist**, v. 20, p. 102-119, 2015

MATSAS, A. et al. Chronic Stress in Pregnancy Is Associated with Low Birth Weight: A Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 24, 2023.

MIKOŁAJKÓW, A.; MAŁYSZCZAK, K. Biological factors and consequences of pregnancy-related anxiety – What do we know so far? **Psychiatria Polska**, v. 56, n. 6, p. 1289–1314, 2022.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 6 SUPPL. 1, p. 5–10, 2002.

MONK, J. M. et al. Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. **Placenta**, v. 26, n. 10, p. 835–838, 2005.

MORRISON, A. E.; FLEMING, S.; LEVY, M. J. A review of the pathophysiology of functional hypothalamic amenorrhoea in women subject to psychological stress, disordered eating, excessive exercise or a combination of these factors. **Clinical Endocrinology**, v. 95, n. 2, p. 229–238, 2021.

MORTON, J. S.; CARE, A. S.; DAVIDGE, S. T. Mechanisms of uterine artery dysfunction in pregnancy complications. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 69, n. 6, p. 343–359, 2017.

MULDER, E. J. H. et al. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. **Early Human Development**, v. 70, p. 3–14, 2002.

NAPSO, T. et al. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–39, 2018.

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

PAFFARO, V. A. et al. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v. 24, n. 5, p. 479–488, 2003.

PAN, Z. et al. Impacts of Cold-Stress Stimulation On Mice Pregnancy. **American Journal of Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 348–353, 2023.

PETER O'LEARY et al. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 667–672, 1991.

PIQUER, Beatriz; FONSECA, Jose L.; LARA, Hernán E. Gestational stress, placental norepinephrine transporter and offspring fertility. **Reproduction**, v. 153, n. 2, p. 147-155, 2017.

RAVUSSIN, Y. et al. Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy Homeostasis in mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

RIVIER, C.; VALE, W. Influence of corticotropin-releasing factor on reproductive functions in the rat. **Endocrinology**, v. 114, n. 3, p. 914–921, 1984.

ROBERTSON, M. J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 2, p. 173–183, 2002.

ROBSON, A. et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. **FASEB Journal**, v. 26, n. 12, p. 4876–4885, 2012.

RUAN, T. et al. Association between low ambient temperature during pregnancy and adverse birth outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Chinese Medical Journal**, v. 136, n. 19, p. 2307–2315, 2023.

SADLER, T. W. Establishing the embryonic axes: Prime time for teratogenic insults. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 4, n. 3, 2017.

SEILEIT, C. et al. Development, Homeostasis, and Heterogeneity of NK Cells and ILC1. In: Vivier, E., Di Santo, J., Moretta, A. (eds) Natural Killer Cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 395, p.37--61, 2015.

SHORE, A. M. et al. Cold Induced changes in gene expression. In brown adipose tissue, White adipose Tissue and Liver. **Plos one**, v. 8, n. 7, 2013.

SOJKA, D. K. Uterine Natural Killer Cell Heterogeneity: Lessons From Mouse Models. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. February, p. 1–7, 2020.

STANEVA, A. et al. The effects of maternal depression, anxiety, and perceived stress during pregnancy on preterm birth: A systematic review. **Women and Birth**, v. 28, n. 3, p. 179–193, 2015.

TARGINO, A. C. et al. Surface ozone climatology of South Eastern Brazil and the impact of biomass burning events. **Journal of Environmental Management**, v. 252, n. August, p. 1–12, 2019.

TOUFEXIS, D. et al. Stress and the Reproductive Axis. **J Neuroendocrinol**, Malden. v.26, p.573–586, 2014.

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

VALSAMAKIS, G.; CHROUSOS, G.; MASTORAKOS, G. Stress, female reproduction and pregnancy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 100, p. 48–57, 2019.

VERMEULEN, A. Environment, human reproduction, menopause, and andropause. **Environ Health Perspect.** v. 101, n. 2, p. 91–100, 1993.

VIAU, V.; MEANEY, M. J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2503–2511, 1991.

WALLACE, A. E.; FRASER, R.; CARTWRIGHT, J. E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: A remodelling partnership. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 4, p. 458–471, 2012.

WANG, D. et al. Effect of cold stress on ovarian & uterine microcirculation in rats and the role of endothelin system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2020.

WANG, R. et al. The effects of chronic unpredicted mild stress on maternal negative emotions and gut microbiota and metabolites in pregnant rats. **PeerJ**, v. 11, p. 1–22, 2023.

Wei Z, Wang Y, Wang S, Xie J, Han Q, Chen M. Comparing the effects of polystyrene microplastics exposure on reproduction and fertility in male and female mice. **Toxicology**, v. 465, 2022.

WHETTLOCK, E. M. et al. Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. June, p. 1–14, 2022.

XIE, X. et al. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p. 510–518, 2005.

YARIBEYGI, H. et al. The impact of stress on body function: A review. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1057–1072, 2017.

ZAVAN, B. et al. COX-2 plays a role in angiogenic DBA+ uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. **Placenta**, v. 44, p. 34–45, 2016.

ZAVAN, B. et al. Splenectomy Delays Uterine Natural Killer Cell Recruitment to Implantation Sites and Prolongs Pregnancy in Mice. **Anatomical Record**, v. 295, n. 7, p. 1221–1228, 2012.

ZHANG, D. et al. Reactive Oxygen Species Are Essential for Vasoconstriction upon Cold Exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

ZHANG, J. et al. Natural killer cell-triggered vascular transformation: Maternal care before birth?. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2011.

ZHANG, L. et al. Gestational exposure to titanium dioxide nanoparticles impairs the placentation through dysregulation of vascularization, proliferation and apoptosis in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 777–789, 2018.

ZHANG, X. Y.; JING, B. BIN; WANG, D. H. Cold exposure does not decrease serum leptin concentration, but increases energy intake and thermogenic capacity in pregnant Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). **Zoology**, v. 112, n. 3, p. 206–216, 2009.