

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- UNIFAL-MG

ÉVILA DA SILVA LOPES SALLES

**RESPONSIVIDADE DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER UTERINAS*
DBA⁺ ÀS ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS DURANTE A PREENHEZ DE
CAMUNDONGOS**

Alfenas/MG, 2014

ÉVILA DA SILVA LOPES SALLES

**RESPONSIVIDADE DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER UTERINAS* DBA⁺ ÀS
ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS DURANTE A PREENHIZ DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pelo Programa de Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior.

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva

Dedico a Deus, pelas bênçãos em minha vida; aos meus pais, João Batista e Lázara e aos meus irmãos, Débora e João Pedro, pelo apoio, amor, paciência e companheirismo; e ao meu orientador, Prof. Dr. Valdemar P. Junior, pela confiança e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos que recebo, por tomar conta dos mínimos detalhes em minha vida e por ouvir as menores das minhas preces.

Aos meus pais, João Batista e Lázara, por se esforçarem todos os dias para que eu chegasse até aqui, por me ensinarem sobre respeito e responsabilidade e por todo amor e carinho.

Aos meus irmãos Débora e João Pedro, e ao meu cunhado Régis, por serem meus companheiros de todas as horas, por toda a paciência, amor e amizade.

À minha avó Therezinha e ao meu tio José Carlos, por terem tido grande participação na minha caminhada e por todo o amor que sempre encontro em vocês.

Ao meu namorado, Wesley Fernandes Fonseca, pelo amor e apoio em todos os momentos.

Aos meus sogros, Ana e Enio Fonseca, por se preocuparem com meu bem estar e por todo o carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior, por ter acreditado na minha capacidade, por ter sido presente, pelo ótimo exemplo profissional, além da amizade e apoio, sempre presentes.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho e Silva, pela contribuição intelectual neste trabalho e pela oportunidade de aprender coisas novas.

Às professoras Andréa M. do Amarante Paffaro, Marisa Ionta e ao professor Alexandre G. Paiva por contribuírem de maneira efetiva na minha formação acadêmica e profissional, pelo carinho e amizade.

Ao meu amigo e colega de laboratório João Gabriel de Almeida, por contribuir de maneira efetiva para realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Fernando Felicione, Bruno Zavan, Fabiana Vilela, Simone Hanneman, Rodrigo Pereira, Rodolfo Cabral, Leilane Sales, Thaila Viana, Elisraily Elias, Camila Pernambuco e Renato Horvat, pelos momentos de convivência e alegria.

Aos meus amigos de ensino médio e às minhas amigas Glaucia Lima e Michele Molina, pela amizade e presença constantes.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Maria Antonieta Nogueira Alvarenga, pela simpatia, educação e solicitude.

Às funcionárias do LABAInt, Neusa Hipólito e Isabel Passos, pelo carinho e auxílio.

A João Francisco Vitório Rodrigues, responsável pelo Biotério Central da UNIFAL-MG, e a toda sua equipe, por terem contribuído para a realização deste trabalho.

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

À Universidade Federal de Alfenas por contribuir com a realização deste trabalho

A todos aqueles que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Navegar é preciso; viver não é preciso”
Pompeu Magno 106-48 a.C.

RESUMO

Alterações nutricionais na gestação podem ter consequências no organismo materno e na prole, as quais podem ser esclarecidas por meio da análise dos componentes uterinos durante a gestação em modelos animais. Dentre estes componentes, podemos destacar as células Natural Killer uterinas (uNK) que representam 70% da população linfocitária no útero gestante de murinos e seres humanos. O presente trabalho teve o fito de avaliar os efeitos da alteração nutricional durante a gestação de camundongos por meio de estudo morfológico e comportamental. Foram utilizados camundongos prenhes os quais receberam a partir do 1º dia de gestação (ddg) ração controle (RC), hipercalórica (HC)-carboidrato 77,7%, hiperlipídica (HL)- gordura 32,5%, hiperproteíca (HP)- proteína 31,26% e foram submetidos a restrição alimentar (RA)- 4g de RC/dia. Todos os animais foram sacrificados no 10º ddg. Foram realizadas análises relacionadas à ingestão, comportamentais, morfológicas, citoquímicas, imunocitoquímicas, morfométricas e estereológicas com enfoque nas uNK. Os resultados mostraram que não ocorreu alteração na ingestão e na glicemia dos grupos experimentais, embora tenha ocorrido aumento do peso de animais HL e diminuição em RA. Na análise comportamental o grupo RA apresentou um estado ansiolítico, já HL exibiu estado semelhante à apatia. Parte das fêmeas RA e HC apresentaram falha gestacional, e em RA foram identificados sítios de implantação (SI) em reabsorção. As análises por meio da citoquímica de lectina DBA, estereológica e imunocitoquímica demonstraram que as rações HL e HC foram capazes de causar as alterações mais marcantes nas uNK, diminuindo a expressão de N-acetil-D-galactosamina (Nac-D-Gal) na superfície e grânulos das uNK, o que possibilitou a observação de um subtipo alterado destas células (uNKa), com grânulos menos reativos à perforina em seus interiores. No endométrio, ocorreu aumento da reatividade para Casp-3 e diminuição na expressão de α -actina da musculatura de seus vasos. Em animais HP e RA as alterações foram menos proeminentes com relação às uNK. Em HP ocorreram menor número de células uNKa, aumento dos subtipos morfológicamente senescentes, pequena identificação de casp-3, e grande expressão de α -actina

vascular. À semelhança dos animais controle, em RA, as uNKa eram raras e não houve alteração na expressão de perforina e α -actina dos vasos, no entanto, parece ter ocorrido atraso na diferenciação das células uNK e aumento na presença de casp-3. Tais resultados demonstraram, pela primeira vez, que alterações na dieta de camundongos, até o 10^o ddg, são capazes de desencadear a resposta das uNK DBA reativas no microambiente uterino.

Palavras chave: Células uNK. Dieta Hiperlipídica. Dieta Hipercalórica. Dieta Hiperproteica. Nutrição na gestação.

ABSTRACT

Nutritional changes during pregnancy can be harmful to the mother's body and have direct effects in offspring, which can be clarified by uterine components analyses during pregnancy in animal models. Among these components, we can highlight the uterine natural killer cells (uNK), which representing 70% of the lymphocyte population in the murine and humans pregnant uterus. This work aims to evaluate the effects of nutritional changes during mice pregnancy through morphological and behavioral studies. Pregnant mice have received from 1st gestation day (gd) control diet (CD), high- carbohydrate (HC) carbohydrate- 77.7%, high-fat (HF) - 32.5% fat, high-protein (HP) - protein 31.26% and were exposed to food restriction (FR) – 4g CD/day. The animals are killed at 10th gd. Intake, behavior, morphology, cytochemistry, immunocytochemistry, morphometry and stereological Analyzes was undertaken by focusing on uNK. Our data showed that food intake and blood glucose levels of all experimental groups didn't change, although the weight increased in the HF and decreased in the FR animals. Behavioral analysis in the FR group showed an anxiolytic state, since HF exhibited similar apathy state. Part of the female FR and HC had gestational failure, and implantation sites (SI) resorption were identified in the FR. Analyses by DBA lectin cytochemistry, immunocytochemistry and stereological studies showed HF and HC diets were able to cause marked changes in uNK, decreasing the expression of uNK surface and granules Gal-D-NAc, which enabled the observation of an DBA-lectin altered kind of uterine NK cell (uNKa), with less reactivity to the perforin in their granules. In the endometrium, there was an increased reactivity for Casp-3 and a decreased expression of the α -actin vessels. The changes were less prominent in the uNK from HP and RA animals. HP uNKa were smaller in number than in HF and HC, and had increased morphological senescent uNK subtype, weak casp-3 reaction and strong blood vessels α -actin expression. Similarly to the control animals, in FR, the uNKa were rare, and there was not changes in the perforin or actin vessels expression. However, the FR animals showed a apparently delay in the uNK differentiation as large presence of casp-3. These results showed for the first time different diets could triggering uNK

DBA-reactive response as can change mouse uterine microenvironment up to 10th gd.

Key-words: uNK cells. High-fat. High-carbohydrate. High-protein. Pregnancy nutrition

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM-	região anti-mesometrial
CTG-	célula trofoblástica gigante
Casp 3-	caspase 3-clivada
DAB-	lectina <i>Dolichos biflorus</i> aglutinina
DB-	decídua basal
DAPI-	marcador nuclear (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)
Ddg-	dia de gestação
E-	embrião
FAO-	Food and Agriculture Organization
HC-	ração Hipercalórica
HL-	ração Hiperlipídica
HP-	ração Hiperproteica
M-	região mesometrial
Mi-	miométrio
RA-	restrição alimentar
RC-	ração controle
R1-	região 1
R2-	região 2
R3-	região 3
SI-	sítio de implantação
uNK-	célula <i>Natural Killer</i> uterine

uNKa- célula *Natural Killer* uterine alterada

WHO- World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama mostrando o total e a distribuição dos animais utilizados nos grupos experimentais.....	39
Figura 2-	Diagrama de sítios de implantação no 10º ddg.....	45
Figura 3-	Gráfico de análise de ingestão.....	54
Figura 4-	Ganho de peso das fêmeas prenhes.....	56
Figura 5-	Análise do comportamento no 10ºddg.....	58
Figura 6-	Teste de reconhecimento espontâneo de objetos.....	59
Figura 7-	Análise da exploração dos objetos A3 e B.....	60
Figura 8-	Média do número de sítios de implantação por animal (SI/Animal).....	62
Figura 9-	Fotomicrografias dos sítios de implantação corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).....	63
Figura 10-	Gráfico da análise de glicemia.....	64
Figura 11-	Subtipos de células uNK DBA+.....	67
Figura 12-	Distribuição dos subtipos de células uNK DBA+ do grupo HL.....	69
Figura 13-	Distribuição dos subtipos de células uNK DBA+ do grupo HC.....	71
Figura 14-	Distribuição dos subtipos de células uNK DBA+ do grupo HP.....	74
Figura 15-	Distribuição dos subtipos de células uNK DBA+ do grupo RA.....	76
Figura 16-	Análise morfométrica dos 4 subtipos de células uNK DBA reativas.....	77
Figura 17-	Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo RC.....	80
Figura 18-	Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HL.....	81
Figura 19-	Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HC.....	84

Figura 20-	Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HP.....	86
Figura 21-	Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo RA.....	88
Figura 22-	Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo RC.....	90
Figura 23-	Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo HL.....	92
Figura 24-	Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo HC.....	94
Figura 25-	Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo HP.....	95
Figura 26-	Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo RA.....	96
Figura 27-	Fotomicrografias de imunocitoquímica para α -actina.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	BIOLOGIA DAS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS (UNK)	19
2.2	NUTRIÇÃO E GESTAÇÃO	28
2.2.1	Dieta hiperlipídica e gestação	28
2.2.2	Dieta hipercalórica e gestação	31
2.2.3	Dieta hiperproteica e gestação	33
2.2.4	Restrição alimentar e gestação	34
3	Objetivos	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	ANIMAIS	38
4.2	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	38
4.3	DIETAS	40
4.4	ANÁLISE DA INGESTÃO DAS PRENHES	41
4.5	ANÁLISE DE GLICEMIA	41
4.6	GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES	42
4.7	ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL	42
4.8	PROCESSAMENTO PARA EMBEBIÇÃO EM PARAFINA	43
4.9	CITOQUÍMICA COM LECTINA DBA	43
4.10	ESTUDO ESTEREOLÓGICO EM MICROSCOPIA FOTÔNICA	44
4.11	ESTUDO MORFOMÉTRICO EM MICROSCOPIA FOTÔNICA	46
4.12	IMUNOCITOQUÍMICA PARA PERFORINA	46
4.13	IMUNOFLORESCÊNCIA PARA CASPASE 3-CLIVADA	47
4.14	IMUNOCITOQUÍMICA PARA A-ACTINA	48

4.15	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO	50
4.15.1	Análise do comportamento semelhante à ansiedade	50
4.15.2	Análise de reconhecimento de objetos	51
4.15.3	Análise de comportamento semelhante à depressão	52
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5	RESULTADOS.....	54
5.1	ANÁLISE DA INGESTÃO DAS FÊMEAS PRENHES.	54
5.2	ANÁLISE DO PESO DAS FÊMEAS PRENHES	55
5.3	ANÁLISE COMPORTAMENTAL	57
5.4	ANÁLISE DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E VIABILIDADE GESTACIONAL	60
5.5	ANÁLISE CITOQUÍMICA, ESTEREOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS CÉLULAS UNK	65
5.5.1	Análise citoquímica e estereologica.....	65
5.5.2.	Análise morfométrica.....	77
5.6	ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA.....	78
5.6.1	Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo RC	78
5.6.2	Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo HL.....	81
5.6.3	Análise Imunocitoquímica para perforina grupo HC.....	82
5.6.4	Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo HP.....	85
5.6.5	Análise Imunocitoquímica para perforina grupo RA.....	87
5.6.6	Imunofluorescência para Caspase 3-clivada	89
5.6.3	Imunocitoquímica para α-actina	97
6	DISCUSSÃO	100
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

As células *Natural Killer* uterinas (uNK) representam cerca de 70% da população de linfócitos presentes no útero durante a gestação. No 10º dia de gestação (ddg) as uNK diferenciadas atingem seu maior número e liberam grandes quantidades de citocinas, como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e o Interferon- γ , os quais promovem a angiogênese e a remodelação das artérias uterinas, respectivamente, garantindo a manutenção da decídua e nutrição do embrião. Além disso, apesar de fisiologicamente a capacidade citotóxica das células uNK seja reduzida, a resposta citotóxica pode ser ativada mediante estímulos que caracterizem-se como insultos à gestação.

Há uma subpopulação de células uNK, a qual pode ser distinguida no ambiente uterino em camundongos através da técnica de citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus aglutinina*), a qual se liga seletivamente ao açúcar N-acetil-D-galactosamina, presente na membrana e grânulos citoplasmáticos das células uNK. No 10º dia de gestação, em camundongos cerca de 95% das células uNK são DBA reativas (uNK DBA⁺), enquanto 5% não apresentam reatividade para esta lectina (uNK DBA⁻). A ausência, ou mesmo o baixo número de células uNK, podem levar a graves falhas no processo gestacional e até o fim do mesmo.

Foi ressaltado por pesquisadores a necessidade de uma melhor investigação dos componentes uterinos, de mães submetidas à alterações nutricionais, durante o período gestacional para o melhor entendimento das consequências da alteração nutricional sobre a gestação e, também, sobre a prole.

Já em 1991 o Ministério da Saúde, no Brasil, apontava os distúrbios alimentares como um dos maiores contribuintes para promoção de complicações durante a gestação contribuindo com 15% a 20% das causas clínicas. O estado nutricional durante a gestação é um dos fatores modificáveis mais importantes para a saúde da mãe e do filho.

Devido as alterações que parte da sociedade vem sofrendo quanto ao estilo de vida, onde observamos aumentado consumo de gorduras e carboidratos, há uma maior preocupação com o que este cenário, juntamente com a realidade da

desnutrição em alguns países, pode acarretar à saúde da mãe e do feto em desenvolvimento.

Portanto, pelo fato de as células uNK se tratarem de células centrais para o entendimento da gestação, tanto de murinos quanto de seres humanos, aliado ao fato de haver carência de informações quanto a sua reponsividade frente a alterações nutricionais, propusemos esse trabalho prospectivo com o fito de analisar as células uNK, seu microambiente e a viabilidade gestacional frente a dietas heterogêneas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica traz conhecimentos amplos e atualizados sobre a biologia das células *Natural Killer* uterinas, bem como, a importância do estado nutricional para a gestação de mamíferos, particularmente roedores e seres humanos.

2.1 BIOLOGIA DAS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS (UNK)

As células *Natural Killer* (NK), são linfócitos que atuam nas fases iniciais da resposta imune contra patógenos microbianos exibindo função citotóxica, secretando uma série de citocinas e quimiocinas (CARLINO et al, 2008). Semelhante aos linfócitos T e B, as NK se originam de um precursor na medula óssea de onde migram posteriormente para o sangue e órgãos linfoides secundários. Entretanto não necessitam do timo para se desenvolverem (ABBAS et al, 2000; CROY et al, 2000; PARSLOW; STITES; TERR, 2004).

As células podem ser recrutadas para desempenharem suas funções em tecidos mucosos como o útero. Este libera grandes quantidades de hormônios para recrutar células NK que, uma vez presentes no útero, irão contribuir para o desenvolvimento adequado do ambiente uterino e, conseqüentemente do embrião, durante a gestação (ZHANG et al, 2011).

Durante a gestação, tanto no útero de roedores como de humanos, podem ser encontradas células NK, que foram caracterizadas como células *Natural Killer* específicas do ambiente uterino por meio de estudos imunocitoquímicos e em animais transgênicos (GUIMOND et al, 1997, 1998; CROY et al, 2000; ZHANG et al, 2009), sendo, portanto, denominadas células *Natural Killer uterinas* (*uNK*).

As NK de humanos podem ser identificadas pela presença de CD56 na sua membrana e pela ausência de moléculas CD3 (PARSLOW et al, 2004). De maneira semelhante, as células *uNK* apresentam CD56 e ausência de CD3, entretanto podem ser diferenciadas das NK circulantes (cNK) pela ausência de CD16 (CD56+ CD3- CD16-) (HATTA et al, 2009; ACAR et al, 2010).

Ainda em humanos, além de presentes durante a gestação, as NK uterinas são encontradas no endométrio não grávido e na decídua basal, sendo possível verificar alterações no número destas células durante o ciclo menstrual e gravidez (PEEL, 1989).

Durante o ciclo menstrual há um aumento significativo de células uNK na fase secretória, observando-se ao final desta fase um pico no número destas células, que irá diminuir durante a menstruação (KING et al, 1998).

Ainda durante a fase secretória, Li et al (2001), evidenciaram que as células uNK presentes no útero de humanos expressam fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C), fator de crescimento placentário (PLGF), e angiopoetina 2 (Ang-2). Estas observações sugeriram aos autores que as células *Natural Killer uterinas* desempenham um importante papel na angiogênese e regeneração do endométrio.

Além de contribuir para a angiogênese e regeneração do endométrio humano durante o ciclo menstrual, foi sugerido por Igarashi et al (2001) que as células uNK desempenhariam um importante papel no início do processo de menstruação. Tal apontamento foi elucidado a partir da observação de grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzima B, proteínas envolvidas no processo de morte celular programada, juntamente com a evidência de aumento na quantidade de células glandulares endometriais em apoptose no fim da fase secretória e durante o processo menstrual.

Em camundongos, as células *uNK* podem ser encontradas no útero a partir do 5º ou 6º dia de gestação (ddg) sendo que entre o 8º e 12º ddg há um aumento no número dessas células (GAMBEL et al, 1985; CROY; KASSOUF, 1989; PAFFARO JR et al, 2003), não sendo mais observadas no útero pós-parto (STEWART; PEEL, 1981; DELGADO et al, 1996). Tais células se acumulam na região mesometrial dos sítios de implantação de camundongos formando o chamado agregado linfóide mesometrial da prenhez (MLAp) que inicialmente recebeu a denominação de glândula metrial (STEWART; PEEL, 1981; CROY; KISO, 1993; LOKE; KING, 2000), apesar de não se constituir em uma estrutura glandular (CHANTAKRU et al, 2001).

Chantakru e colaboradores (2001) afirmaram que o acúmulo de células uNK no útero se deve ao recrutamento de células precursoras (pré-UNK) provenientes de órgãos linfóides como o baço.

Estudos em humanos revelaram a presença de precursores hematopoiéticos CD34⁺ no útero que após recrutados para o ambiente uterino se diferenciam em células uNK (KESKIN et al, 2007; MALE et al, 2010; VACCA et al, 2011). Em camundongos foi demonstrado que no início da gestação células NK precursoras (NKP) imaturas NK1.1⁺DX5⁻ migram para o útero onde sofrem diferenciação celular gerando as células *Natural Killer uterinas* (CHIOSSONE et al, 2014).

Demonstrando a importância de órgãos linfoides como fonte de células uNK, estudo com camundongos fêmeas esplenectomizadas antes da prenhez demonstrou que a retirada do baço foi capaz de atrasar a chegada, maturação e senescência das uNK, bem como atrasar o desenvolvimento da decídua materna, da placenta, e o parto, sem contudo inviabilizar a gestação ou afetar a prole (ZAVAN et al, 2012).

Estudos citoquímicos, tem utilizado a lectina *Dolichos biflorus agglutinina* (DBA) que se liga seletivamente a glicoconjugados contendo N-Acetil-D-Galactosamina nas células uNK de camundongos (PAFFARO JR. et al, 2003; BIANCO et al, 2008; ZAVAN et al, 2010; ZAVAN et al, 2012; LIMA et al, 2012). A especificidade desta lectina para a membrana plasmática e grânulos das células NK uterinas permitiu a caracterização de quatro subtipos correspondentes às formas de maturação destas células no útero de camundongos durante a gestação (PAFFARO JR. et al, 2003).

Paffaro et al (2003) descreveram estes 4 subtipos, sendo as células uNK do subtipo I e II as mais imaturas, a do subtipo III a forma madura e a do subtipo IV aquela morfológicamente considerada senescente. Segundo os mesmos autores, estas células migram da região mais distante do embrião, ou seja, mais próxima ao miométrio (região 1), para regiões mais próximas ao embrião (regiões 2 e 3), sendo que, no 10^o dia de gestação, os subtipos I e II, ocorrem em sua maioria na região 1 e os III e IV nas regiões 2 e 3, preferencialmente.

Zavan et al (2010), sugeriram que a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência das uNK de camundongos podem estar relacionadas com a expressão de fibronectina na matriz extracelular endometrial, uma vez que o aumento e diminuição dessa molécula no microambiente uterino coincidem respectivamente com o aumento em número e diminuição de células uNK no útero de camundongos.

De acordo com Zhang et al (2009), 95% das células uNK presentes no útero de camundongos durante a gestação são reativas à lectina DBA, e assim passaram a ser denominadas células uNK DBA⁺, enquanto os outros 5% são uNK DBA⁻. Tanto

as uNK DBA⁺ quanto as uNK DBA⁻ são positivas para a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS) e essas duas populações celulares (DBA⁺ PAS⁺ e DBA⁻ PAS⁺) diferem na produção de citocinas e fatores angiogênicos (ZHANG et al, 2011).

Estudos recentes (CHEN et al, 2012) demonstraram que as células DBA⁺ chegam ao útero através da circulação, originadas de uma célula progenitora da medula óssea e transcrevem uma grande quantidade de IL-22, enquanto as células DBA⁻ são residentes do útero e expressam altos níveis de Interferon gama (IFN- γ).

Além da produção de fatores como o IFN- γ , as uNK possuem grânulos que armazenam enzimas como a perforina e granzimas, indicando um potencial citolítico. Kopcow et al (2005) demonstraram que, apesar das células uNK apresentarem tal potencial, elas também mostram uma redução da sua capacidade citotóxica causada, em parte, pela não expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no trofoblasto.

Durante a implantação, estas células encontram-se em íntimo contato com as células trofoblásticas, sugerindo que as células uNK possam reconhecer tais células como sendo oriundas do feto e regular sua invasão (LOKE; KING, 1995) uma vez que não apresentam atividade citotóxica contra elas (KING et al, 2000). No que diz respeito à função das células uNK aliada com seu possível papel citotóxico, estudos de Trundley e Moffet, em 2004, afirmam que as células *Natural Killer* uterinas podem sofrer modificação de sua função após ligação de seus receptores com moléculas de MHC não clássicas (HLA-G, HLA-E e HLA-C) expressas pelas células trofoblásticas oriundas do embrião. Essa referida modificação de sua função pode influenciar significativamente no processo de invasão do trofoblasto.

As células uNK de humanos possuem repertório de receptores do tipo KIR (*Killer immunoglobulin-like receptors*), de acordo com estudos realizados por Hiby e demais colaboradores (1997). Tais receptores estão envolvidos com a ativação e inibição da citotoxicidade das células NK (LANIER, 1998; TROWSDALE, 2001; RAULET; VANCE; MCMAHON, 2001). Em gestações que culminaram em aborto espontâneo, foi observado que os receptores KIR inibitórios estavam ausentes, demonstrando, dessa forma, a importância dos receptores KIR nas uNK de humanos, em relação a citotoxicidade e a manutenção da gestação (VARLA et al, 2005).

Tal como ocorre em humanos, há receptores expressos nas células uNK em camundongos que regulam a citotoxicidades destas células. Tais receptores são

denominados de Ly49 (*Killer cell lectin-like receptors*) e apresentam a capacidade de reconhecimento e ligação ao MHC-1, permitindo a ativação ou mesmo a inibição da atividade de NK (TROWSDALE, 2001; RAULET et al, 2001; BRENNAN et al, 1996; KING et al, 2000). Sabe-se que em células NK de camundongos, o reconhecimento do MHC durante a resposta imune inata ocorre primeiramente via receptores Ly49 (MAKRIGIANNIS; ANDERSON, 2001).

Diferentemente dos receptores KIR presente em humanos, os receptores da família Ly49 são classificados como sendo receptores transmembrana do tipo II e constituem uma família de 11 genes (Ly49A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, Q), além de 4 pseudogenes descrito no genoma de camundongos da linhagem C57BL/6 (B6) e 9 outros genes adicionais, identificados em diferentes linhagens de camundongos (SMITH et al, 1998; MCGUEEN et al, 1998; KUSAKABE et al, 2007).

Tais genes estão presentes no cromossomo 6 numa região denominada de "Natural Killer gene complex" (PLOUGASTEL; YOKOYAMA, 2006). De acordo com estudo publicado por Makrigiannis e Anderson em 2001, um determinado gene Ly49 é expresso em apenas um subtipo de células NK e parece que genes Ly49 individuais são escolhidos por meio de um processo aleatório durante uma distinta janela de oportunidade.

O primeiro receptor Ly49 identificado em NK foi descrito ainda em 1992 por Karlhofer, Ribaldo e Yokoyama, demonstrando que o receptor Ly49A está envolvido na inibição da atividade lítica de NK quando aparecem ligados em moléculas do complexo de MHC de classe I H-2Dd e Dk expressos em células alvo. Função semelhante a esta fora relacionada com o receptor Ly49G, sendo que a inibição da atividade lítica da célula *Natural Killer* é observada apenas quando as células alvo expressam grande quantidade de MHC de classe I H-2D^d e/ou L^d (MASON et al, 1995). Foi demonstrado ainda que as células NK Ly49C⁺ possuem capacidade de se ligarem a múltiplos haplótipos de MHC de classe I do tipo H-2, incluindo H-2D^d, H-2^k, H-2^s e H-2^b (YU et al, 1996).

Os receptores Ly49 inibidores possuem um domínio citoplasmático denominado de ITIM (*immunoreceptor Tyrosine-based inhibitory motif*). Este imunorreceptor se torna fosforilado em resposta à ligação ao Ly49, recrutando, posteriormente, SHP-1 fosfatase e atenuação da sinalização intracelular (OLCESE et al, 1996; NAKAMURA et al, 1997).

Já os receptores da família Ly49 ativatórios, como o Ly49D, por exemplo, necessitam da associação de uma molécula sinalizadora adicional (DAP-12) que contém um domínio de ligação citoplasmático denominado como ITAM (“*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*”). Tal ligação é importante a fim de transmitir o sinal da ativação (MASON et al, 1998; LANIER et al, 1998). Para o DAP-12 se ligar, por sua vez, é necessário um resíduo transmembrana de arginina contido no Ly49D; resíduo este que também se encontra presente no Ly49H (MAKRIGIANNIS; ANDERSON, 2001).

Kusakabe et al (2007) demonstraram que o tratamento de camundongos com danazol provocou aumento na expressão de genes Ly49A, Ly49C, integrina $\alpha 5$ e fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) no 1º dia de gestação. Tal resultado indica que a atuação do danazol, droga frequentemente usada com finalidade de tratamento à endometriose, possa promover o recrutamento das células uNK.

Estudo utilizando diferentes doses de danazol evidenciou que na concentração de 7,5 mg/Kg esta provocou aumento no número de células uNK no 10º dia de gestação. Já dosagens de 0,75 mg/Kg e 75 mg/Kg causaram diminuição neste número, demonstrando que há efeito dose dependente de danazol no número de células Natural Killer uterinas. A análise dos subtipos de células uNK mostrou que danazol promoveu elevada migração destas células para o ambiente uterino e que, em doses elevadas, pode ter ocorrido prejuízo na proliferação celular, além de ter acelerado a diferenciação celular em áreas próximas ao embrião (TAVARES, 2011).

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

Podemos perceber, porém, que as células *Natural Killer* uterinas desempenham outras funções importante durante o processo gestacional, como o auxílio à implantação. Nesse sentido durante a implantação do blastocisto no endométrio uterino, as células uNK produzem e liberam interleucina 8 (IL-8), a qual induz aumento na secreção de MMP-2 (metaloproteinase-2) pelas células trofoblásticas, esta metaloproteinase promove a desagregação da matriz

extracelular na face materna auxiliando no processo de implantação (DE OLIVEIRA et al, 2010).

Estudos realizados por Ashkar e Croy (1999) mensuraram a concentração de IFN- γ em homogeinados da região mesometrial de sítios de implantação embrionários e identificaram o aumento significativo dessa citocina pró-inflamatória no início da gestação (entre 5^o e 6^o ddg), período este que coincide com o aumento em número das células uNK. O pico de concentração de IFN- γ ocorre de maneira concomitante ao pico do número de células uNK (10^o ddg). Após esse período, tanto a concentração de IFN- γ quanto a quantidade de uNK decaem até o final da gestação. A produção de IFN- γ pelas células uNK parece ocorrer por estímulo de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-12, IL-15 e IL-18 (YU et al, 2006).

Existem vias de sinalização as quais o IFN- γ pode atuar para promover a expressão de vários genes. Uma importante via relacionada a esta citocina é a JAK/STAT-1 (Janus tyrosine kinases/signal transducer and activator of transcription), onde, após a ligação de uma molécula de IFN- γ ao seu receptor (IFN γ R), uma enzima JAK é ativada para fosforilar um STAT-1 o qual é capaz de promover a transcrição de diferentes genes, como o gene para IRF-1 (LIU et al, 2008; MURPHY et al, 2009) que possui uma ação indireta na diferenciação final das uNK (ASHKAR et al, 2003).

Uma análise do conteúdo dos grânulos das células uNK demonstrou a heterogeneidade funcional destas células, uma vez que elas expressam fatores angiogênicos e citotóxicos. Essa dupla capacidade funcional seria possível devido à secreção controlada de enzimas lisossomais e proteínas citotóxicas, enquanto a secreção de fatores angiogênicos ocorreria de maneira constitutiva (LIMA et al, 2012).

Apesar de fisiologicamente a capacidade citotóxica das células uNK ser reduzida, acredita-se que sua resposta citotóxica pode ser ativada mediante estímulos caracterizados como insultos à gestação. Prova disso é que a injeção intraperitoneal de Lipopolissacarídeo de *E. coli* (ZAVAN, 2011) e a eutanásia embrionária intrauterina (LIMA et al, 2012) foram capazes de diminuir a reatividade dos grânulos das uNK ao anti-corpo anti-perforina, sugerindo a provável ação citotóxica destas células frente a esses insultos.

A endotoxemia ocasionada através da injeção de LPS foi capaz ainda de alterar o padrão de reatividade das células uNK para à lectina DBA levando à

observação de um subtipo adicional de células uNK, além daqueles originalmente caracterizados por Paffaro et al (2013). Esse subtipo adicional exibia grânulos ou superfície ou ambos não reativos à lectina DBA e foi denominado de célula Natural Killer alterada (uNKa) (ZAVAN, 2011). Células uNK semelhantes as uNKa foram também observadas em estudos onde foi procedida a eutanásia cirúrgica intrauterina do embrião (ROMAN, 2001; COPI, 2006 e LIMA et al, 2012).

Em nosso laboratório, foi demonstrado recentemente (dados ainda não publicados), que o pré-tratamento com nimesulida, um anti-inflamatório inibidor da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) é capaz de atenuar as alterações observadas pelo tratamento com LPS sobre as células uNK. O pré-tratamento com a nimesulida resultou numa queda significativa de uNKa além de restabelecer a reatividade à lectina DBA. Tal resultado sugere que as alterações evidenciadas pela injeção de LPS podem ocorrer através de prostaglandinas.

A mifepristona (RU-38486,) através de tratamento in vitro, em baixas dosagens, aumentou o número de células CD56(+) NK e a porcentagem de células CD3(-)CD56(+)CD16(-)NK no endométrio receptivo de humanos. Pesquisadores observaram também que o tratamento com mifepristona aumentou significativamente a citotoxicidade das células uNK isoladas de úteros gravídicos durante a fase receptiva. Ou seja, o uso de mifepristona, em baixas dosagens, aumentou a citotoxicidade das células uNK podendo fazer com que haja uma destruição do microambiente uterino, afetando de modo imunológico o endométrio, prejudicando a gestação (ZHOU et al, 2011; CHEN et al, 2010).

Em humanos, as células uNK são frequentemente denominadas células Natural Killer decíduais dNK (WALLACE; FRASER; CARTWRIGHT, 2012) e expressam grandes quantidades de um tipo de molécula de adesão de célula neural (NCAN), o receptor CD56. Mais de 95% das dNK tem o fenótipo CD56^{bright}CD16⁻ e não são citotóxicas enquanto a maioria das células NK circulantes com função citotóxica são CD56^{dim}CD16⁺ (STARKEY; SARGENT; REDMAN, 1988; KALKUNTE et al, 2008) e expressam fatores angiogênicos incluindo VEGF, PGF, ANG2 and TGFB1 (LI et al, 2001; JOKHI et al, 1994).

À semelhança do encontrado em camundongos, estudos em humanos evidenciaram a existência de subtipos distintos de uNK, o que ocasionou a denominação diferencial de tais células, as células *Natural Killer* endometriais (eNK) (MANASTER et al, 2010) e as células *Natural Killer* decíduais (dNK) propriamente

ditas (HO et al., 1996; HANNA et al, 2006; MANASTER; MANDELBOIM, 2010). As *eNK* correspondem ao subtipo encontrado no endométrio uterino não gravídico, já as *dNK* seriam aquelas que são recrutadas ao útero apenas durante a gestação (MANASTER; MANDELBOIM, 2010). Ambos os tipos expressam receptores *KIR* e possuem grânulos citoplasmáticos com conteúdo citolítico (HIBY et al, 2008)

Foi evidenciado por Seaward et al (2010) que alterações metabólicas, como a diabetes, podem alterar o número de células *uNK* no útero gestante e interferir no desenvolvimento da gestação. Estes pesquisadores demonstraram que o útero de camundongos diabéticos (NOD- Non-obese diabetic) possui menor quantidade de *uNK* que limita as modificações nas artérias espiraladas da placenta. Estes mesmo autores demonstram ainda que em camundongos NOD nocautes em *IFN-γ* (*d-NOD.IFNγ^{-/-}*) há má formação da decídua basal e do *agregado linfocitário mesometrial da prenhez (MLAp)*, sendo que este apresenta tamanho semelhante ao da placenta e possui células *uNK* grandes e hipogranulares, resultando em anormalidades morfológicas dos sítios de implantação.

Apesar de todo conhecimento acumulado a respeito das funções e respostas a diferentes estímulos das células *uNK* de murinos e seres humanos, são escassos os relatos a respeito do efeito de alterações nutricionais nestas células, as quais tem importância singular no ambiente uterino durante a gestação. Além disso, trabalhos recentes com humanos as *uNK* têm sido citadas como importantes para o diagnóstico de risco de falha reprodutiva (KURODA et al, 2013), o que tem evidenciado também sua importância na área médica.

Segundo Douglas (2010) alterações na nutrição durante a gestação, como restrição de proteínas ou aumento de carboidratos, podem afetar a prole. Entretanto, esta autora menciona que ainda não é conhecido se a alteração dos nutrientes durante a gestação, *per si*, ou se o estresse provocado por esta alteração é que leva a modificação do ambiente intrauterino e às consequências na prole. Douglas apontou a necessidade de uma melhor investigação dos componentes uterinos e de mães submetidas a alterações nutricionais, durante o período gestacional para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e dos efeitos na prole.

Portanto, por se tratar de célula central para o entendimento da gestação, tanto de murinos quanto de seres humanos, aliada à da carência de informações quanto a sua responsividade frente a alterações nutricionais, propusemos esse

trabalho prospectivo com o fito de analisar as células uNK, seu microambiente e a viabilidade gestacional frente a dietas heterogêneas.

2.2 NUTRIÇÃO E GESTAÇÃO

O estado nutricional durante a gestação é um dos fatores modificáveis mais importantes para a saúde da mãe e do filho. Durante a gestação ocorrem diversas adaptações no metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos para assegurar que o feto receba condições nutricionais necessárias para seu desenvolvimento (VITOLLO, 2008).

Dentre as adaptações nutricionais que ocorrem durante o período gestacional, podem ser citadas o aumento do apetite e da eficiência digestiva e absorptiva do tubo digestivo, o aumento do volume intracelular, o aumento no débito cardíaco e no fluxo sanguíneo renal e periférico, o aumento na ventilação pulmonar, a formação de estoque de nutrição e aumento na produção de insulina (PARIZZI; FONSECA, 2010).

Durante a gestação é recomendado que a mulher coma alimentos não industrializados, sendo que a dieta diária de uma gestante deve conter entre 80 a 85% de alimentos de origem vegetal e somente 15 a 20% de origem animal. Além disso, outras recomendações são feitas à gestante, como, por exemplo, comer devagar, evitar o excesso de sal, açúcar e bebidas alcóolicas e fazer várias refeições por dia, evitando, dessa forma, comer muito em uma única refeição (HEMMINKI; STARFIELD, 1978; NICHOLS; NICHOLS, 1983; OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

2.2.1 Dieta hiperlipídica e gestação

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO- World Health Organization) cerca de um em cada dez adultos são obesos, levando a obesidade a

ser considerada uma epidemia em diversas regiões do mundo. No Brasil cerca de 40% a 59,9% da população está acima do peso.

No ano de 2008, 14% das mulheres no mundo eram obesas (índice de massa corpórea ≥ 30 kg/m²), comparado com 8% registrado no ano de 1980. De acordo com Guelinckx et al (2008) a prevalência de mulheres grávidas obesas pode variar entre 1.8% e 25.3% de acordo com o país, sendo que no Brasil estimava-se que cerca de 21% das mulheres grávidas estavam acima do peso e cerca 27% eram obesas.

Estudos relacionando obesidade e gestação mostraram que a obesidade pode trazer prejuízos à saúde da mãe e ao desenvolvimento da prole. Problemas gerados pela obesidade podem se iniciar até mesmo antes da concepção, acarretando em problemas de ordem reprodutiva, uma vez que há, em mulheres obesas, uma alta prevalência de Síndrome do Ovário Policístico (SOP), a qual promove alterações endócrinas, interferindo na ovulação e menstruação podendo, até mesmo, promover infertilidade (EHRMANN, 2005).

Em um levantamento bibliográfico realizado por Boots e Stephenson (2011), foi observado que há uma alta taxa de aborto espontâneo em mulheres obesas, que conceberam naturalmente ou passaram por tratamento de infertilidade (WANG; DAVIES; NORMAN, 2002), comparado com mulheres não obesas.

Um estudo realizado com camundongos fêmeas *Lethal Yellow* (LY) e C57BL/6 alimentadas com dieta rica em gordura (*B6-High Fat Diet*), ambos exibindo fenótipos semelhantes à obesidade humana, sugeriram que o aumento dos níveis de insulina e leptina decorrente da obesidade, pode aumentar as concentrações de progesterona circulante, além de alterar a atividade transcricional durante o crescimento do oócito e/ou comprometer mecanismos de tradução e degradação de RNA durante a maturação do oócito, modificando, dessa forma, a quantidade de RNA mensageiro. Essas mudanças provavelmente são responsáveis pela baixa viabilidade do ovócito e pelo comprometimento da embriogênese (POHLMEIER et al, 2014).

Durante a gestação, a obesidade pode promover, também, complicações tais como macrossomia fetal, trabalho de parto prolongado, parto cirúrgico, restrição de crescimento intra-uterino e prematuridade (ASSUNÇÃO et al, 2007). Outro risco recorrente relacionado à obesidade materna é a má formação do tubo neural, mesmo em condições normais de ácido fólico (VITOLLO, 2008).

Além de acarretar problemas para o feto o excessivo ganho de peso aumenta o risco das mães desenvolverem diabetes mellitus gestacional (DMG), hipertensão e pré-eclâmpsia (ATHUKORALA et al, 2010). De acordo com Vitolo (2008), gestantes que apresentam excesso de peso, possuem risco duas a seis vezes maior de desenvolverem diabetes e hipertensão durante a gestação.

No caso da DMG, esta é definida como qualquer nível de intolerância a carboidratos, resultando em altos índices glicêmicos originado ou diagnosticado durante a gestação (KUZUYA et al, 2002), A própria gestação é um processo que torna mais susceptível o desenvolvimento de diabetes devido à presença de hormônios diabetogênicos (progesterona, cortisol, prolactina e hormônio placentário) e a ocorrência de redução na secreção de insulina (EVANS; PATRY, 2004; MIRANDA; REIS; 2006).

Quando a gestante apresenta um elevado nível de glicose, este pode induzir o feto a produzir insulina, a qual por sua vez pode promover um aumento indesejado de tecido adiposo fetal, além do aumento da lipogênese fetal e um excessivo depósito de gordura, resultando em um bebê obeso, considerado de risco (WORTHINGTON; WILLIANS, 1997).

Sabe-se que a obesidade é originada de diversos fatores, os quais envolvem aspectos genéticos e ambientais (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004). A obesidade pode ser considerada uma patologia complexa que abrange processos, não só metabólicos, como também psicológicos, neurológicos, sociais, culturais e ambientais (ISOSAKI; CARDOSO, 2006). Não só a quantidade (volume de ingestão alimentar), bem como, a qualidade (composição) da dieta tem sido relacionadas à obesidade (TRICHES; GIUGLIANI, 2005).

Liang et al (2010), na busca de investigar as alterações decorrentes da diabetes durante a gestação, ofereceram dieta rica em gordura (41%) para fêmeas de camundongo por um mês antes da concepção e também durante a gestação. A dieta, indutora da obesidade, foi capaz de promover ganho de peso e resistência à insulina. Além disso, foi observado perda de trofoblasto e dano celular no endotélio do labirinto da placenta destas fêmeas, prejudicando a gestação.

Em um trabalho realizado com 110 gestantes com sobrepeso pré-gestacional, onde a dieta destas gestantes foi analisada, observou-se que entre essas mulheres a contribuição energética proveniente de lipídios (29% das calorias) ficou bem próxima ao máximo recomendado (NASCIMENTO; SOUZA, 2002).

Além de trazer consequências para a gestação estudos demonstram que a obesidade, ou até mesmo a *overnutrition* (supernutrição) na gestação aumenta o risco da prole desenvolver as chamadas síndromes metabólicas (hipertensão, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares) na vida adulta (AVIRAM et al, 2011; ALFARADHI; OZANNE, 2011).

Em um estudo de Desai et al (2014), ratas prenhes foram tratadas com dieta rica em gordura somente durante a gestação, somente durante a lactação e um terceiro grupo de ratas recebeu a dieta durante ambos os períodos. Foi observado que o consumo de dieta rica em gordura apenas no período de gestação levou a um aumento no tecido adiposo da prole, embora esta não apresentasse aumento no peso. Em contra partida, na prole de fêmeas que consumiram a dieta somente durante o período de lactação, foi observado aumento em ambos os parâmetros. Foi relatada também a presença de distúrbios metabólicos em todos os grupos (durante a gestação e/ou lactação) como hiperglicemia e elevada pressão sanguínea, ilustrando, desse modo, que a exposição à obesidade ou a uma dieta rica em gordura em diferentes períodos do desenvolvimento pode ser prejudicial à saúde da prole.

Um estudo realizado com ratos durante a adolescência mostrou que a exposição perinatal destes animais a uma dieta rica em gordura diminuiu o comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, notou-se que a dieta foi capaz de promover a alteração de expressão de genes de receptores de glicocorticoides e vários genes inflamatórios no hipocampo e na amígdala, interferindo na saúde mental dos animais utilizados no estudo (SASAKI et al, 2014).

Portanto, os dados expostos na literatura revelam que o consumo de dietas ricas em gordura, bem como a obesidade, podem afetar de maneira significativa a fertilidade materna e a qualidade de vida da prole até mesmo na vida adulta, podendo acarretar em consequências variadas que vão desde o desenvolvimento de síndromes metabólicas até alterações de comportamento que merecem ser melhor investigadas.

2.2.2 Dieta hipercalórica e gestação

De acordo com Akarolo-Anthony et al (2013), está ocorrendo uma transição na dieta de países em desenvolvimento como a Nigéria, por exemplo. Segundo os autores, vem ocorrendo uma modificação na principal fonte de carboidratos nesse país devido à rápida urbanização, aumento da preferência pela dieta ocidental, fatores sociais, econômicos e culturais. Devido à alteração da dieta, constatou-se que grande parte da população analisada neste estudo estava acima do peso.

Foi demonstrado por Slabber et al (1994) que uma dieta com baixo índice glicêmico, consumo moderado de carboidratos, pode promover perda de peso significativo em mulheres obesas.

Já em 2000 dados epidemiológicos sugeriram que tanto a quantidade, bem como a qualidade, dos carboidratos seria um fator de extrema relevância no desenvolvimento de dislipidemia, doenças cardiovasculares e diabetes, principalmente entre indivíduos que possuem susceptibilidade à resistência à insulina, com elevado índice de massa corporal (IMC) (LIU et al., 2000; WILLETT; MANSON; LIU, 2002).

Como descrito no item anterior, o excesso de peso pode acarretar grandes alterações na gestação, trazendo prejuízos à saúde da mãe e do feto em desenvolvimento. Além de promover patologias como a diabetes, a ciência tem observado outras interferências da dieta rica em carboidrato, altamente calórica, na gestação. Em humanos, por exemplo, foi observado que uma dieta com excesso de carboidrato pode limitar o crescimento da placenta e promover o baixo peso ao nascer dos filhos, principalmente se o alto consumo de carboidratos for acompanhado por uma dieta pobre em proteína (GODFREY et al, 1996).

Resultado semelhante foi observado por Sferruzzi-Perri et al (2013), que estudaram camundongos prenhes que consumiram uma dieta rica em açúcar e gordura. Tal dieta promoveu redução do crescimento feto-placentário e elevação na expressão de transportadores de ácidos graxos na placenta.

Na busca de uma melhor compreensão acerca do impacto da obesidade proveniente de dieta rica em caloria, Akyol, Langley-Evans e McMullen (2009), ofereceram dieta de cafeteria (altamente calórica) para ratas Wistar prenhes. Foi constatado que a dieta promoveu obesidade nas fêmeas e levou a redução do peso fetal da prole no 20º dia de gestação.

Além de efeitos na gestação, foi revelado por Jacobs et al (2014), que o consumo da dieta de cafeteria por ratas prenhes afeta a regulação dos hormônios

reprodutivos de machos na prole obtida após tratamento, refletindo em prejuízos na performance sexual destes machos quando adultos.

Fan et al (2013) realizaram um estudo com primatas onde as fêmeas prenhes receberam ração de alta caloria (36% de caloria a mais que o normal) durante a gestação. Os resultados da pesquisa de Fan et al revelaram que o consumo de uma dieta hipercalórica durante este período aumenta o risco de obesidade e de doenças cardiovascular relacionadas em fases tardias da vida da prole, independente da mãe estar ou não obesa durante a gestação.

Não é somente o alto valor calórico promovido pelo do consumo elevado de carboidratos que pode acarretar prejuízos à gestação. El-Sayyad et al (2010), mostraram que camundongos prenhes que tiveram suas dietas suplementadas com batata frita durante o período gestacional apresentaram alterações no fígado, rins, músculo cardíaco e cartilagem epifisária. Além disso, ocorreu aumento na taxa de aborto e mortalidade neonatal, entre outras modificações. Segundo estes autores a batata frita possui alta quantidade de acrilamida, a qual é considerada carcinogênica e é produzida em alimentos ricos em amido, quando estes são cozidos, assados ou fritos em altas temperaturas.

2.2.3 Dieta hiperproteíca e gestação

Ao contrário do observado na literatura a respeito dos efeitos do consumo excessivo de gordura, carboidratos ou da desnutrição na saúde humana, escassos são os estudos sobre o consumo de altas quantidades de proteína durante a gestação e o efeito desse consumo a curto e longo prazo.

Sabe-se que uma mulher adulta normal e não grávida necessita de cerca de 0,8g de proteína por kg por dia, sendo 1/3 de origem animal e 2/3 de origem vegetal (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998). Durante a gestação recomenda-se um consumo de cerca de 1,1g/kg/dia (1/3 de origem animal e 2/3 de origem vegetal) (SHILS; OLSON; SHIKE, 2006).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) (2008), o consumo de carne, a qual é uma das principais fontes de proteína, vem crescendo entre 5% e

6% ao ano em países em desenvolvimento. Em uma pesquisa realizada por Carvalho (2012) mostrou que 75% da população da cidade de São Paulo consome carne de maneira excessiva.

Foi relatado na literatura que o consumo excessivo de proteínas por mulheres durante a gravidez pode levar a um aumento na incidência de prematuridade (ROSSO; CRAMOY, 1979). Um aumento de 10g na ingestão de proteína absoluta por dia em mulheres no final da gestação, foi associado com uma redução de 17,8g no peso do recém-nascidos (ANDREASYAN et al, 2007).

Em estudo realizado com porcos prenhes que consumiram dieta rica em proteína e com baixo carboidrato durante a gestação, foi verificado que a dieta promoveu mudanças na concentração de hormônios e nos níveis de expressão de genes codificadores de receptores e enzimas que contribuem na regulação dos níveis de cortisol fetal e a ação deste. Entre estas alterações estão incluídas, por exemplo, o aumento do cortisol materno e ritmo de cortisol diurno desregulado. Além disso, foi observado que no 94º dia de gestação os fetos apresentavam redução do peso corporal. Em contrapartida, o peso relativo do cérebro destes fetos estava aumentado, segundo os autores, devido ao excesso de proteína ingerido pela mãe (KANITZ et al, 2012).

2.2.4 Restrição alimentar e gestação

Entre 1944 e 1945, final da II Guerra Mundial, o vilarejo de Dutch na Alemanha teve seu fluxo de alimentos interrompido devido à guerra, o que promoveu a desnutrição entre a população daquela região. Foi observado que mulheres que estavam grávidas, nesse período, deram à luz a crianças de baixo peso, e que, entre essas crianças, a maioria dos meninos se tornaram obesos ao atingirem idade entorno de 19 anos (LEANDRO et al, 2009). Este é considerado um dos primeiros indícios de como a falta de alimento em quantidade suficiente, pode alterar a próxima geração na vida adulta.

Estudos mostraram que a restrição de nutrientes durante a gestação pode promover a restrição do crescimento intrauterino (IURG- *intrauterin restriction*

growth). Uma das consequências do IUGR seria a alteração da expressão de genes relacionados à nefrogênese o que acaba elevando o risco de desenvolvimento de hipertensão na vida adulta (JONES et al, 2012).

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FOA), atualmente cerca de 925 milhões de pessoas no mundo não consomem alimento em uma quantidade suficiente para serem consideradas saudáveis (2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2010) listou a desnutrição materna como um importante desafio a ser enfrentado pelos órgãos de saúde, não só pelo elevado número de mulheres desnutridas, mas também pelo fato de que mães desnutridas podem levar ao mau desenvolvimento do feto e riscos de complicações durante a gestação. Ainda de acordo com a OMS, a desnutrição materna é responsável por 4,8 milhões de mortes infantis por ano.

A causa da desnutrição não está estritamente relacionada ao acesso ao alimento, mas também pode ter relação com o desenvolvimento de distúrbios alimentares, os quais podem originar um quadro de desnutrição e anemia. Devido ao medo do ganho de peso decorrente do processo gestacional muitas mulheres podem desenvolver distúrbios alimentares e fazerem uso de métodos para emagrecer durante a gestação (LINNA et al, 2014). De acordo com o ESHRE Capri Workshop Group (2006) mesmo em mulheres não grávidas, os distúrbios alimentares são frequentemente associados com a diminuição na frequência de ovulação acarretando prejuízos à reprodução.

Dentre as alterações bioquímicas e fisiológicas decorrentes da restrição alimentar foi descrito que ratas Fisher apresentaram diminuição da albumina plasmática, do colesterol total e LDL (*Low Density Lipoprotein*), diminuição da AST (Aspartato aminotransferase) e da ureia, concomitante a estes eventos ocorreu aumento na concentração de glicose e creatinina. Fisiologicamente foi observado que as fêmeas apresentaram anestro, diminuição da pressão arterial média e da frequência cardíaca. Além dessas alterações a restrição alimentar também promoveu edema cerebral e pulmonar e diminuição no peso do coração, rim, fígado e diminuição no óxido nítrico plasmático e aumento da atividade simpática no vaso (SOUZA, 2013).

Estudos utilizando modelos animais mostram que a desnutrição pode promover comprometimento na massa corporal das mães, tendo efeitos adversos nos filhotes (MCMILLEN et al, 2008; SCHULER et al, 2008) como alterações no

crescimento, no metabolismo e tamanho e função de órgãos como fígado e pâncreas (MINANA-SOLIS; ESCOBAR, 2007).

Com o intuito de averiguar os efeitos da desnutrição na gestação, em alguns estudos em animais modelo foi investigado o efeito da restrição de proteínas na gestação. Foi observado que a restrição proteica pode promover alteração na expressão de genes envolvidos no crescimento e metabolismo, bem como apoptose e controle epigenético trazendo efeitos deletérios à placenta (GHEORGHE et al, 2009).

Coan et al (2010) demonstraram que a placenta de camundongos submetidos à desnutrição pode sofrer adaptações para tentar ajudar na manutenção do feto em desenvolvimento. Ainda segundo os autores, as adaptações ocorreriam através de modificações na expressão de genes placentários, o que iria alterar o tamanho e a eficiência da placenta em associação com alterações morfológicas, e na expressão de genes transportadores de nutrientes.

Além disso, foi demonstrado que a restrição de proteína em ratas alterou a produção de androgênios pela placenta interferindo na endocrinologia de ratas prenhes, as quais apresentam altos níveis de testosterona e estrógeno no plasma, o que atrasou a maturação sexual de filhotes machos (ZAMBRANO et al, 2005).

Ballen et al (2009) mostraram que ratas prenhes que foram submetidas à restrição proteica até o 18ºddg apresentaram aumento na atividade lipogênica no fígado materno, modificação do perfil hormonal, com aumento de prolactina, redução na massa da placenta e dos fetos. Tais constatações evidenciam, portanto, que a restrição proteica interfere no desenvolvimento normal da gestação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das dietas hiperproteica, hipercalórica, hiperlipídica e da restrição alimentar parcial, durante a primeira metade da gestação, sobre a morfologia uterina, as células uNK DBA⁺ e o comportamento de camundongos prenhes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a viabilidade gestacional e a morfologia do útero dos camundongos prenhes submetidos à alteração nutricional;
- b) Avaliar a morfologia e a expressão de N-Acetil-D-Galactosamina nas células uNK por meio da citoquímica de lectina DBA em camundongos prenhes submetidos à alterações nutricionais;
- c) Avaliar os efeitos de alterações nutricionais na quantidade, incidência e distribuição dos subtipos de células *uNKDBA*⁺;
- d) Avaliar o efeito de alterações nutricionais na expressão de perforina, caspase 3 clivada e alfa-actina no endométrio de camundongos prenhes como parâmetros relacionados respectivamente à citotoxicidade de NK, apoptose e relaxamento ou contração vascular;

- e) Avaliar o comportamento de camundongos prenhes submetidos à alteração nutricional nos parâmetros relacionados à ansiedade, depressão e memória a curto prazo;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para execução desse trabalho de mestrado foram utilizados métodos variados, os quais estão descritos detalhadamente a seguir.

4.1 ANIMAIS

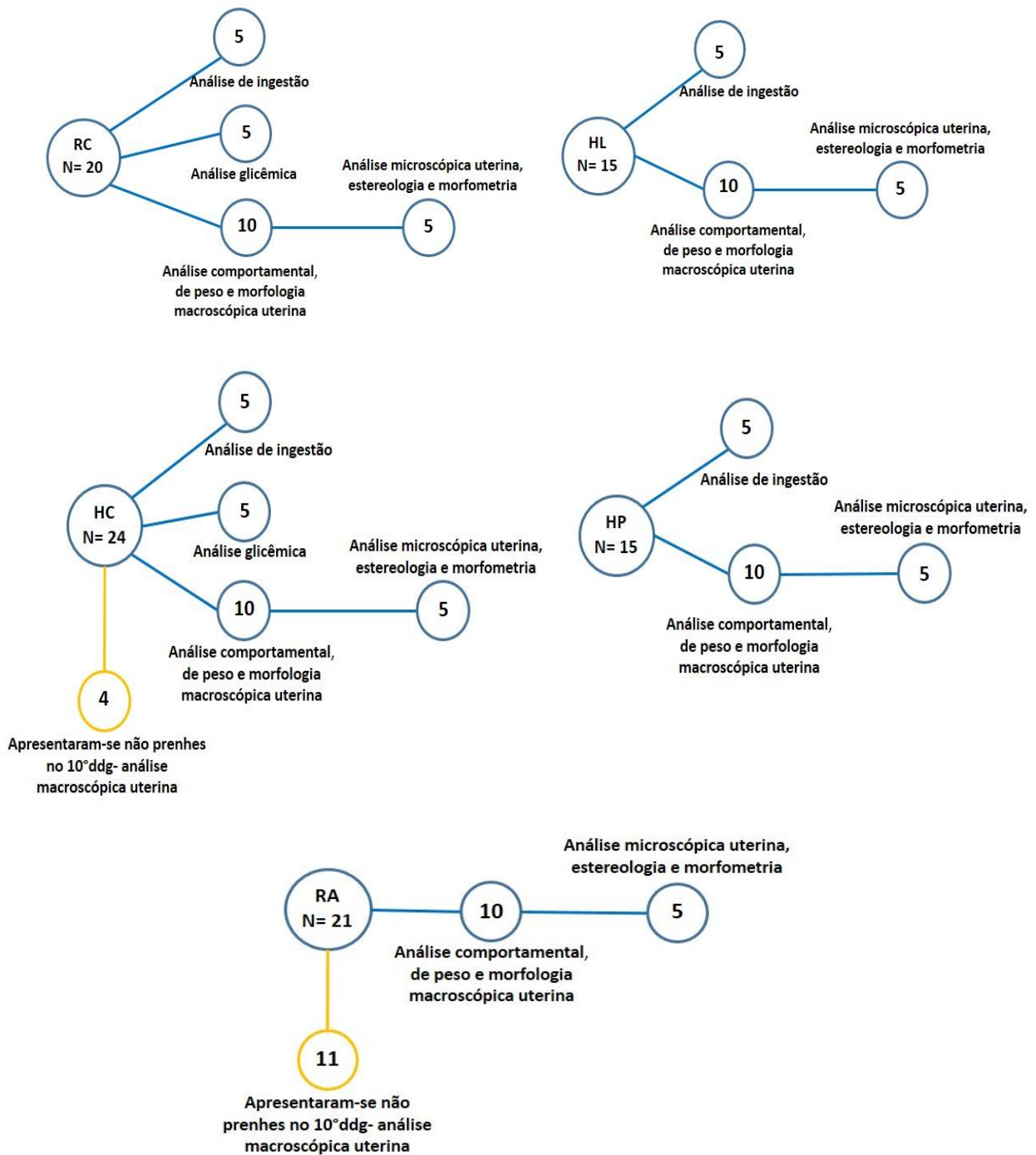
Foram utilizados 95 camundongos fêmeas e 30 machos da linhagem Swiss, provenientes do Biotério da UNIFAL-MG. As fêmeas foram acasaladas com machos da mesma linhagem e o dia em cuja manhã foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado como sendo o 1º ddg. As fêmeas prenhes foram então mantidas em regimes de alimentação variados (vide item 4.3) e acesso à água *ad libitum*, em ciclo de 12/12 horas claro e escuro. Todos os procedimentos com os animais passaram por aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG. (Protocolo 448/2012).

4.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Todos os camundongos prenhes foram analisados no 10º dia de gestação (ddg), período em que ocorre o pico na quantidade de células uNK (PAFFARO JR et al., 2003). Das 95 fêmeas, 20 foram tratadas com dieta controle, 15 com dieta hiperlipídica, 24 com dieta hipercalórica, 15 com hiperproteica e 21 animais foram

submetidos à restrição alimentar (RA), ao qual foi oferecido 4g de ração controle ao dia (**Figura 1**).

Figura 1- Diagramas mostrando o total e a distribuição dos animais utilizados nos grupos experimentais.



Nota: Diagramas mostrando o total e a distribuição dos animais utilizados nos grupos controle (RC), hiperlipídica (HL), hipercalórica (HC), hiperproteica (HP) e restrição alimentar (RA) e as análises realizadas.

Fonte: do autor

4.3 DIETAS

Todas as rações utilizadas foram feitas no laboratório de Análise Nutricional e Toxicológica *in vivo* (Lantin) da UNIFAL – MG, em colaboração com o nutricionista Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva.

Tabela 1- Proporção nutricional das rações (g/100g de dieta).

Composição	Normal	Hiperlipídica (HL)	Hipercalórica (HC)	Hiperproteica (HP)
Caseína	20,00	20,00	15,00	42,00
L-cisteína	0,30	0,30	0,30	0,30
Amido de milho	39,75	13,75	49,75	17,75
Amido de milho dextrinizado	13,20	13,20	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	4,00	2,00	7,00
Pó de celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
AIN-93G mineral mix	3,50	3,50	3,50	3,50
AIN-93G vitamina mix	1,00	1,00	1,00	1,00
Ácido tartárico colina pesado	0,25	0,25	0,25	0,25
Terciário butil hidroquinona	0,0014	0,0014	0,0014	0,0014
banha (animal)	0	29,00	0	0
Total	100,0014	100,0014	100,0014	100,0014

A composição das rações controle e hiperlipídica foram aquelas descritas na literatura por Odaka e colaboradores (2010).

Foi procedida no laboratório da Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco do Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas/SP, a análise de Composição Centesimal para verificar a porcentagem de proteínas, lipídeos e carboidratos, presentes nas rações. A análise centesimal revelou que a ração Hiperproteica continha 31.26% de proteína, Hiperlipídica 32.51% de lipídeo e Hipercalórica 77.7% de carboidrato. Para o grupo de Restrição Alimentar (RA), foi oferecido 4g/dia, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Composição aproximada das dietas experimentais

Dieta	Proteína (%) 1.2.3	Gordura (%) 1.2.3	Cinzas (%) 1.2.3	Humidade (%) 1.2.3	Carboidrato (%) 2.4
Controle	15.30 ± 0.05 ^c	7.09 ± 0.06 ^b	2.15 ± 0.08 ^a	7.25 ± 0.05 ^a	67.21
HL	16.55 ± 0.03 ^b	32.51 ± 0.03 ^a	2.19 ± 0.04 ^a	7.16 ± 0.06 ^a	41.59
HC	10.50 ± 0.05 ^d	2.45 ± 0.03 ^c	2.14 ± 0.09 ^a	7.19 ± 0.03 ^a	77.72
HP	31.26 ± 0.17 ^a	7.07 ± 0.05 ^b	2.18 ± 0.09 ^a	7.15 ± 0.06 ^a	52.34

¹ Valores correspondem a média (±SD) de três determinações;

² Valores expressos em base seca;

³ Valores que não partilham letra semelhante na mesma coluna são diferentes ($p < 0.05$) no teste Tukey;

⁴ Cálculo pela diferença = 100 – (proteína + total gordura + cinzas + humidade).

4.4 ANÁLISE DA INGESTÃO DAS PRENHES

Foi analisado o consumo de ração diário das fêmeas dos grupos RC, HL, HC e HP, a partir do 2º dia de gestação. Toda manhã era inserido no comedouro de cada animal 15g de ração e na manhã seguinte foi descontada a quantidade restante, resultado no valor de ração consumida pelo animal, em gramas. A análise de consumo era realizada sempre no mesmo horário, entre 8 e 9 horas da manhã.

4.5 ANÁLISE DE GLICEMIA

A análise glicêmica foi realizada apenas nos grupos controle (RC) e hipercalórica (HC). A fins de comparação e validação da ração controle utilizada em nosso estudo, foi realizada a análise de glicemia de 5 animais prenhes que receberam a ração normalmente utilizada no Biotério Central da UNIFAL-MG (grupo RB), da marca NUVILAB.

Para análise foram utilizadas glicofitas e glicosímetro da marca *Accu Chek performa*, lote 471563, código 222. A observação ocorreu nos 2,4,6,8 e 10^oddg, pelo período da manhã, sempre no mesmo horário, entre 8 e 9 horas, momento no qual era utilizado uma pequena quantidade de sangue da porção terminal da cauda da fêmea prenhe para obtenção da glicemia em mg/dL.

4.6 GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES

Para verificar alterações no ganho de peso após a administração da dieta por 10 dias os camundongos prenhes foram pesados no 1^o e no 10^o dia de gestação. Para este estudo, foram utilizados os registros de pesos de 10 animais, nos quais, após eutanásia, foram observados sítios de implantação embrionária, ou seja, os registros de peso dos animais que não apresentaram sítios de implantação foram descartados da análise.

4.7 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL

Para análise macroscópica dos sítios de implantação e da viabilidade gestacional foram utilizados 10 dos animais, os quais se encontravam no 10^o ddg. Estes animais tiveram seus sítios de implantação contados e analisados macroscopicamente. Foram observados parâmetros macroscópicos como presença ou não de sítios de implantação, presença de sítios hemorrágicos e sítios em

reabsorção. Por fim foi realizada a média do número de sítios por fêmea em cada grupo.

4.8 PROCESSAMENTO PARA EMBEBIÇÃO EM PARAFINA

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

4.9 CITOQUÍMICA COM LECTINA DBA

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

- a. Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com H₂O₂ (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- c. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;

- d. Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e. Incubação com lectina DBA (*Dolichos biflorus*) biotinada (Sigma Chemical Co. USA) diluída na proporção de 1:300 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- f. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:300 por 1 hora;
- h. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- i. Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250µL) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H₂O₂ 30 vols. (20 µL);
- j. Lavagem com água destilada;
- k. Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos, lavagem em água destilada e diferenciação com solução supersaturada de carbonato de lítio durante 30 segundos;
- l. Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

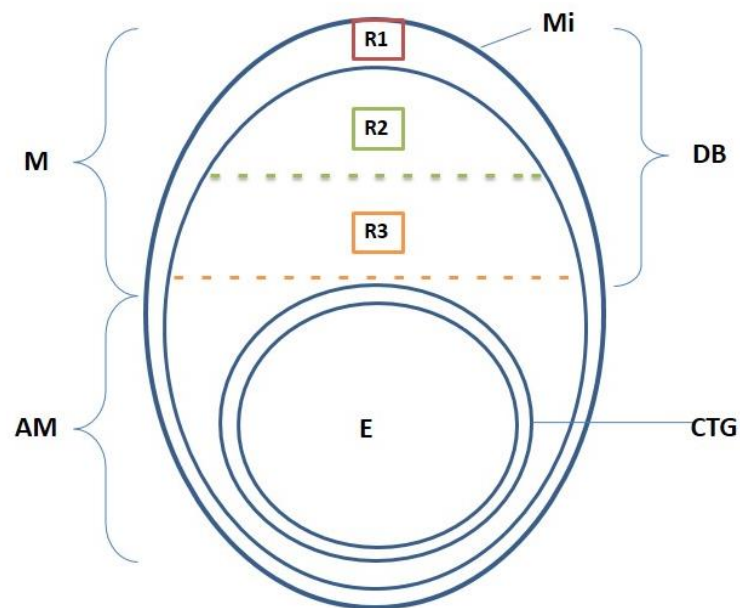
O controle negativo foi realizado pela adição do açúcar inibidor N-Acetil-Galactosamina à solução com Lectina DBA.

4.10 ESTUDO ESTEREOLÓGICO EM MICROSCOPIA FOTÔNICA

Foram analisados, de forma aleatória, 3 cortes histológicos de 3 sítios de implantação embrionários distintos submetidos à citoquímica de lectina DBA,

procedentes de 5 animais de cada grupo experimental para análise estereológica. Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste (AT) $4.10^4\mu\text{m}^2$, dos 4 subtipos distintos de uNK localizados em 3 regiões do útero prenhe de camundongos modificado a partir dos experimentos de Paffaro Jr et al., (2003) **(FIGURA 2)**. A delimitação destas 3 regiões obedece às variações decorrentes do crescimento uterino de acordo com o dia de gestação. A área teste foi delimitada através de um sistema de teste quadrático o qual possui duas linhas de exclusão e assim, foram contadas apenas as células que exibiram o núcleo localizado na área teste nos cortes observados, exceto aquelas que tocaram as duas linhas de exclusão do sistema teste. Células em divisão, dentro de vasos sanguíneos e/ ou sem núcleo aparente também foram descartadas da contagem.

Figura 2- Diagrama de sítio de implantação no 10º ddg



Nota: M- Região mesometrial; AM- Região antimesometrial; DB- decídua basal; Mi- miométrio; E- embrião; CTG- região de células Trofoblásticas Gigante; R1- região 1; R2- região 2; R3- região 3.

Fonte: modificado de Paffaro et al, 2003.

4.11 ESTUDO MORFOMÉTRICO EM MICROSCOPIA FOTÔNICA

Para análise morfométrica foi realizada a média dos diâmetros maior e menor de 10 células uNK de cada subtipo (I, II, III e IV), a medição foi aleatória e foram utilizados 5 animais por grupo dos quais foi calculada a média total dos diâmetros por subtipo para cada um dos grupos experimentais.

4.12 IMUNOCITOQUÍMICA PARA PERFORINA

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

- a. Recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1M pH6,0;
- b. Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- c. Incubação com H₂O₂ (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- d. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- e. Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- f. Incubação com anti-corpo primário, anti-perforina feito em coelho (Thermo Fisher Scientific Inc.), diluído na proporção de 1:50 em PBS/BSA 1% pH 7,4, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- g. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;

- h. Incubação com anti-corpo secundário, *anti-habbit* feito em cabra (Sigma Chemical Co. USA), diluído na proporção de 1:250 em PBS/BSA 1% pH 7,4, por 1 hora em temperatura ambiente;
- i. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- j. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:150 por 1 hora;
- k. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 5 vezes;
- l. Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250µL) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H₂O₂ 30 vols. (20 µL);
- m. Lavagem com água destilada;
- n. Contra-coloração com Hematoxilina de Harrys durante 30 segundos, lavagem em água destilada e diferenciação com solução supersaturada de carbonato de lítio durante 30 segundos;
- o. Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti-perforina no item **4.12f**.

4.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CASPASE 3-CLIVADA

Os cortes histológicos dos sítios de implantação das prenhes foram desparafinizados e hidratados como descrito no item previamente. Após hidratação, os cortes foram submetidos à reação de imunofluorescência como segue abaixo:

- a. Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- c. Incubação com anti-corpo primário, anti-caspase 3-clivada feito em coelho (Rhea Biotech), diluído na proporção de 1:50, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- d. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 10 vezes;
- e. Incubação com anticorpo secundário, anti-coelho feito em cabra/FITC (Sigma Chemical Co. USA), diluído na proporção de 1:500, por 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz;
- f. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 10 vezes;
- g. Incubação com DAPI na proporção 1:4000 (Sigma Chemical Co. USA);
- h. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 10 vezes;
- i. Montagem com glicerol 10% em água destilada;
- j. Os cortes foram então analisados ao microscópio de fluorescência e de contraste de fase diferencial (DIC) (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmara digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti-caspase 3-clivada no item **4.13c**.

4.14 IMUNOCITOQUÍMICA PARA A-ACTINA

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados e hidratados como descrito no item anterior.

Após hidratação, os cortes foram submetidos à reação de imunocitoquímica da seguinte maneira:

- a. Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b. Incubação com H₂O₂ (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- c. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- d. Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e. Incubação com anti-corpo primário, anti- α -actina feito em coelho (Sigma Chemical Co. USA), diluído na proporção de 1:100, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- f. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- g. Incubação com anti-corpo secundário, anti-coelho feito em cabra (Sigma Chemical Co. USA), diluído na proporção de 1:500, por 1 hora em temperatura ambiente;
- h. Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- i. Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:150 por 1 hora;
- j. Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 5 vezes;
- k. Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250 μ L) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 μ L) + H₂O₂ 30 vols. (20 μ L).
- l. Lavagem com água destilada;
- m. Contra-coloração com Hematoxilina de Harrys durante 30 segundos, lavagem em água destilada e diferenciação com solução supersaturada de carbonato de lítio durante 30 segundos;
- n. Os cortes foram então, diafanizados, montados e analisados ao microscópio fotônico como descrito no item **4.9** e **4.12**.

O controle negativo foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti- α -actina no item **4.14e**.

4.15 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

As fêmeas prenhes foram submetidas a testes para análise da ansiedade, retenção de memória a curto prazo e depressão, em busca de possíveis alterações comportamentais causadas pela alteração na dieta.

As análises comportamentais em todos os grupos e até mesmo no grupo controle foram realizadas sempre no 10º ddg, no período da manhã. Os testes de comportamento foram gravados utilizando-se uma câmera de vídeo previamente instalada na sala de análise de comportamento do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) da UNIFAL-MG.

4.15.1 Análise do comportamento semelhante à ansiedade

O labirinto em cruz elevado, LCE, foi validado para testes com camundongos em 1987 pelo pesquisador Lister. O labirinto em cruz é formado por quatro braços com o comprimento de 27 cm que se encontram no centro em uma plataforma de área 6 cm². Dois braços possuem “colunas” com altura de 16 cm e dois são livres destas. Os animais possuem livre acesso aos braços. 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, fechados e no centro do aparato. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 2001, CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

4.15.2 Análise de reconhecimento de objetos

Em relação ao teste de memória, a análise comportamental foi realizada de modo sequencial, dividida em três etapas, uma de aclimatação, a segunda de teste e a terceira fase, experimental. A etapa de aclimatação é realizada com a finalidade de permitir a exploração do animal e habituá-lo à nova localidade na qual foram realizados os testes. O ambiente consiste em uma caixa de madeira (65 x 45 x 45cm) forrada com maravalha (3cm de altura). A sessão de teste foi a filmagem da exposição de 2 objetos idênticos (A1 e A2) a cada animal, no ambiente descrito acima por 5 minutos. Os objetos foram deixados no canto oposto do local onde o camundongo foi colocado. Foi mensurado o tempo gasto na exploração dos objetos A1 e A2 pelo camundongo pela análise do vídeo. Na fase de experimento, os objetos foram trocados por um terceiro (A3) objeto também idêntico aos 2 anteriores e por um quarto objeto (B) totalmente diferente, porém de volume semelhante. Os objetos da fase de experimento foram colocados no mesmo lugar dos objetos da fase teste e o camundongo foi exposto aos objetos e filmado por 5 minutos. Foi mensurado o tempo gasto na exploração de cada objeto. A exploração do objeto foi definida como direcionamento do focinho ao objeto (a uma distância de pelo menos 2 cm) e toque do focinho no objeto (ABE, ISHIDA e IWASAKI, 2004).

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

$$EG = A1+A2$$

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

$$EGT = B+A3$$

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

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

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

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

4.15.3 Análise de comportamento semelhante à depressão

Para detectar comportamento depressivo foi utilizado o teste do nado forçado (“forced swimming test”). Para tanto, foi utilizado um cilindro vertical de vidro, com dimensões de 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, preenchido com água à 30°C até a altura de 20 cm. O volume de água deve permitir que o animal possa nadar ou boiar (—floatll) sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Para o teste, cada camundongo foi colocado no cilindro por 5 minutos e foi avaliado o tempo de latência com que o animal 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 serão analisados, de acordo com a metodologia de Porsolt (1977).

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

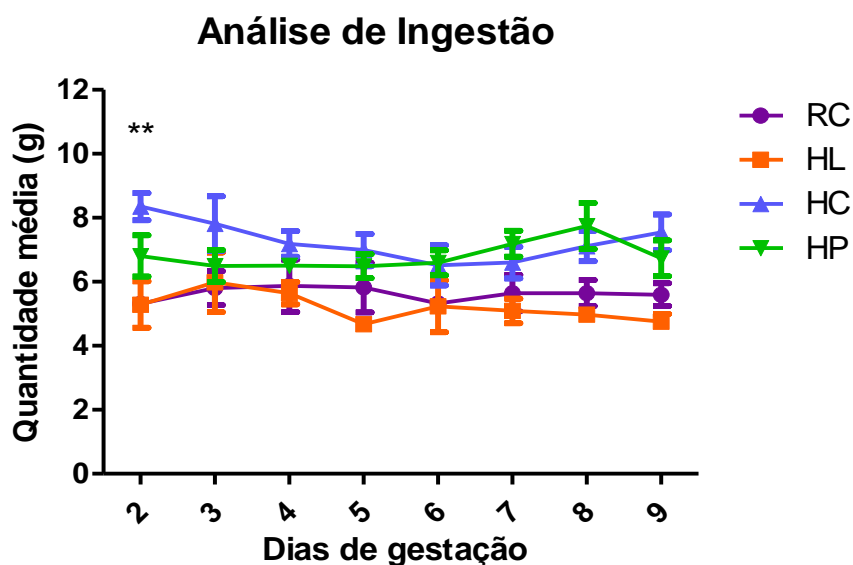
A análise estatística dos dados foi obtida a partir da análise de Coluna estatística para verificar a homocedasticidade dos dados. Após a análise de coluna estatística foi realizado o teste de ANOVA one-way, seguida de pós-teste. A análise do comportamento, estereológica e morfométrica foi obtida através do pós-teste de Comparação Múltipla de Dunnett's, a análise de ingestão foi obtida através do pós-teste de Bonferroni. Já para análise de glicemia foi realizada o teste ANOVA two-way e pós teste de Bonferroni. Com relação as diferenças de peso, estas foram analisadas pelo teste T de Student. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo para os grupos Hiperlipídica, Hipercalórica, Hperproteica e para o grupo de Restrição Alimentar, em relação ao grupo controle, estão descritos detalhadamente a seguir, acompanhados dos respectivos gráficos e fotomicrografias com o fito de documentação desses achados.

5.1 ANÁLISE DA INGESTÃO DAS FÊMEAS PRENHES.

Figura 3- Gráfico de análise de ingestão



Nota: Análise da quantidade média, em gramas (g), de ração consumida do 2º ao 9º ddg. grupos controle (RC), hiperlipídica (HL), hipercalórica (HC) e hiperproteica (HP). $p < 0,01$ (**).

Fonte: do autor

Os dados estatísticos da análise de ingestão mostraram que os animais tratados com ração HC ingeriram mais ração no início da gestação (2º ddg) que os animais tratados com ração controle. No entanto, a partir do 3º ddg o consumo de

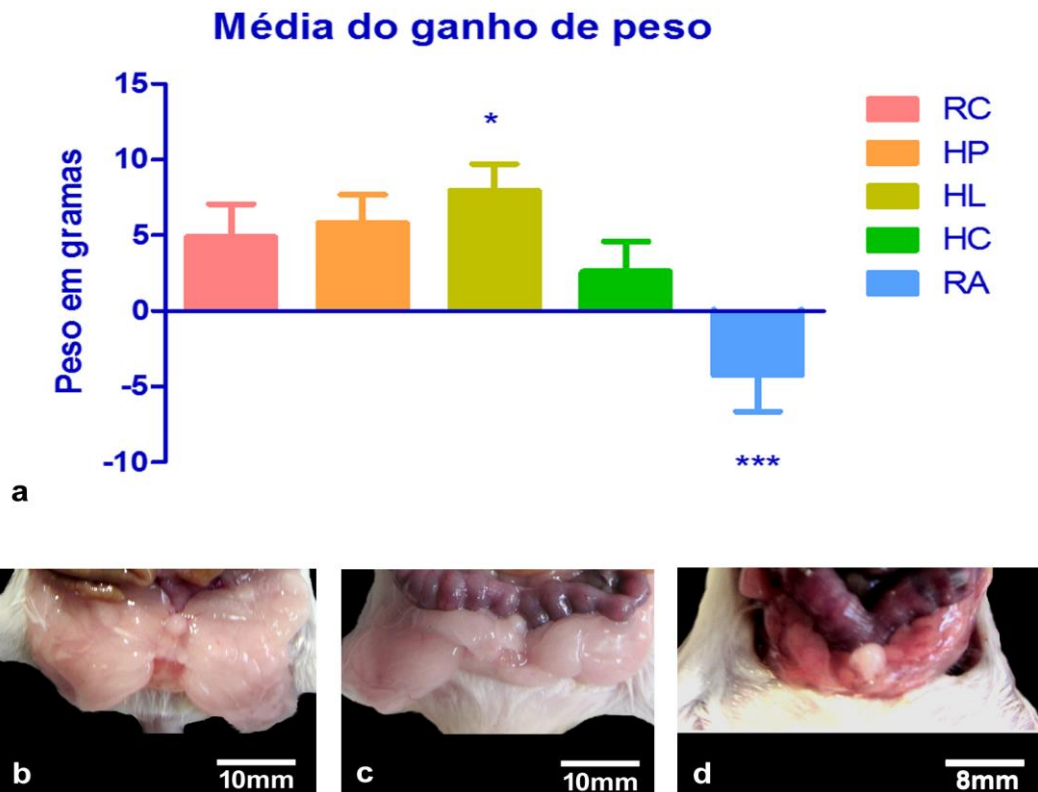
ração por parte desses animais foi igual ($p < 0,01$) aos tratados com ração controle **(Figura 3)**. Nos animais tratados com a ração HL e HP a ingestão de ração foi semelhante ao controle em todos os dias de gestação ($p > 0,05$).

Uma vez que, para o grupo de restrição alimentar (RA) foi oferecido apenas 4g de ração ao dia, este grupo não participou da análise de ingestão. Em todas as manhãs foi constatado que os animais deste grupo haviam consumido toda a ração ofertada.

5.2 ANÁLISE DO PESO DAS FÊMEAS PRENHES

A análise da diferença de peso das fêmeas prenhes no 1° e 10° dia de gestação (ddg) revelou que os grupos HL e RA apresentaram alteração estatisticamente significativa no de peso em relação ao controle **(Figura 4a)**. O ganho de peso médio no grupo HL foi maior (7,31g) que no grupo controle (RC) ($p < 0,05$). As fêmeas HL aparentavam ter maior quantidade de tecido adiposo associado ao útero após laparotomia do que observado nas fêmeas do grupo RC **(Figura 4c e 4b, respectivamente)**.

Figura 4- Ganho de peso das fêmeas prenhes



Nota: Grupo controle (RC), grupo com dieta Hiperproteica (HP), Hiperlipídica (HL), Hiperclorídica (HC) e grupo de Restrição Alimentar (RA) (3a). O gráfico mostra o ganho de peso significativo do grupo HL e a perda significativa do grupo RA, ambos em relação ao controle. Imagens macroscópicas de tecido adiposo ao redor dos sítios de implantação observado em camundongos dos grupos RC (b), HL (c) e RA (d) no 10º ddg. Notar tecido adiposo menos proeminente entorno dos sítios de implantação no animal RA (d).
 $p < 0,05$ (*). $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor

O Grupo RA, por sua vez, teve uma redução ($p < 0,001$) no peso médio (-4,25 gramas) e apresentou pequena quantidade de tecido adiposo associado ao útero prenhe (**Figura 4d**).

Nas fêmeas dos grupos que receberam dieta hiperproteica (HP) e hiperclorídica (HC) os ganhos de peso médios foram de 5,82g e 2,62g respectivamente, e estes valores não foram diferentes estaticamente do ganho de peso de animais controle ($p > 0,05$).

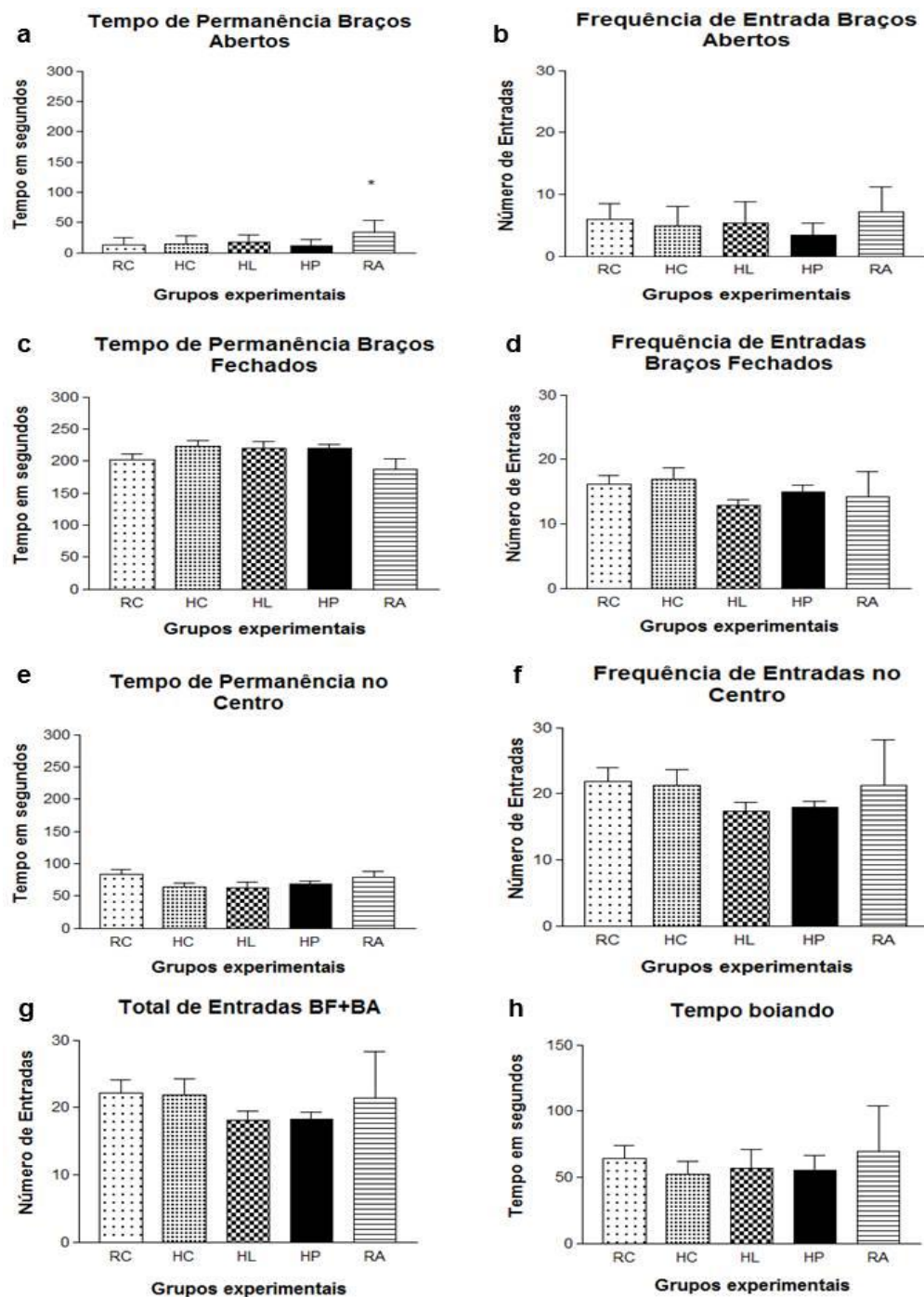
5.3 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A análise do comportamento semelhante à ansiedade, bem como do comportamento depressivo, indicou que não ocorreram alterações comportamentais detectáveis pelos testes realizados com fêmeas prenhes no 10º dia de gestação nos grupos que tiveram dietas alteradas (**Figura 5a – 5h**), exceto no grupo submetido à restrição alimentar (RA) (**Figura 5a**), cujas fêmeas apresentaram alteração significativa de comportamento relacionado à ansiedade, pois permaneceram mais tempo nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado quando comparadas às fêmeas do grupo controle ($p < 0,05$).

Ao observar os resultados obtidos no teste de reconhecimento espontâneo de objetos, pode-se afirmar que não houve alteração na retenção de memória a curto prazo nos animais em todos os grupos analisados (**Figura 6a – 6d**), ou seja, não houve diferença significativa nas taxas de discriminação (**Figura 6d**). Outra razão para afirmar categoricamente que não há diminuição na retenção de memória a curto prazo é a análise da exploração do objeto A3 (**Figura 6b**) e do objeto A3 e B (**Figura 7**) em todos os grupos, uma vez que a exploração do objeto A3 não aumenta significativamente nos grupos experimentais, estando sua exploração semelhante ao controle (RC).

Os animais submetidos à alteração na dieta apresentam uma exploração menor do objeto novo (B), quando comparado ao controle, sem que houvesse uma prevalência de exploração do objeto familiar (A3) (**Figura 6c**). Embora os animais explorassem menos o objeto recém-introduzido, não houve preferência de exploração do objeto familiar em detrimento do objeto novo, mostrando não existir, dessa forma, alteração na memória a curto prazo.

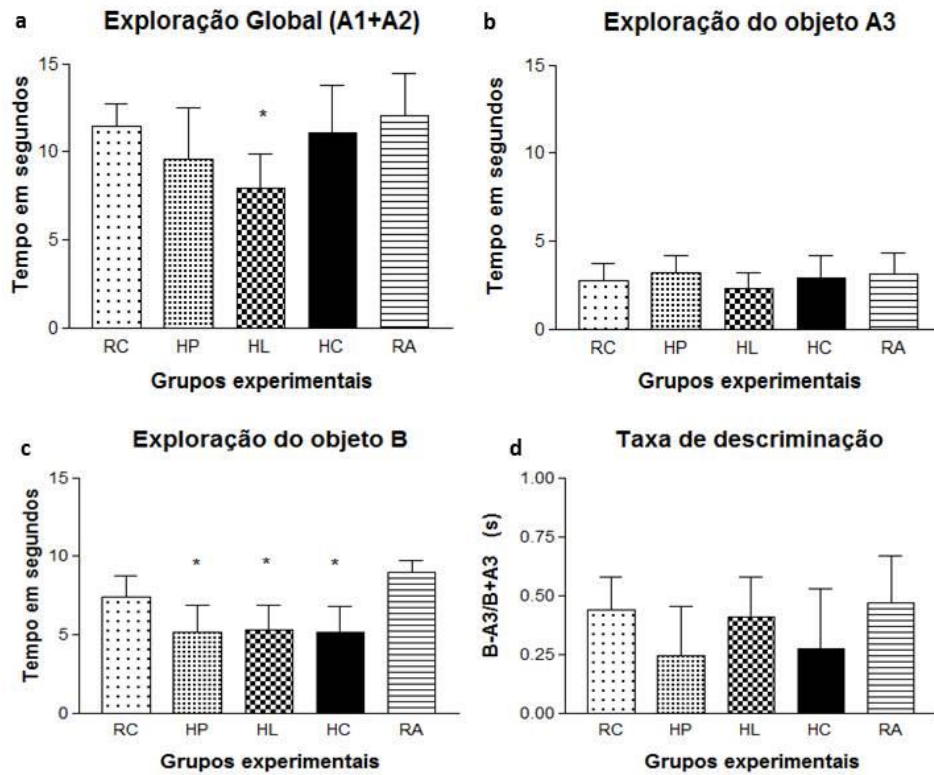
Figura 5- Análise do comportamento de camundongos no 10^o ddg.



Nota: Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (a-g). Grupo Controle (RC); Ração Hipercalórica (HC); Ração Hiperlipídica (HL); Ração Hiperproteica (HP); Restrição Alimentar (RA). Teste do Nado Forçado (h).
p<0,05 (*).

Fonte: do autor

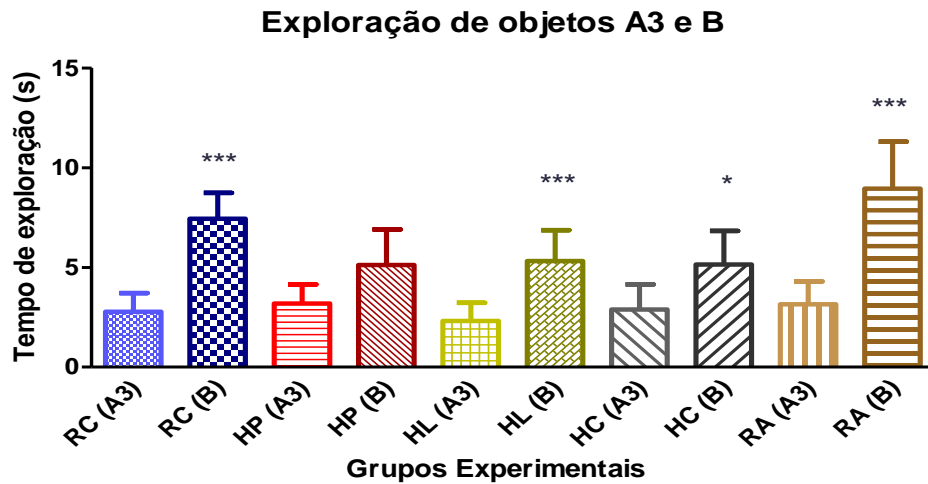
Figura 6- Teste de reconhecimento espontâneo de objetos.



Nota: Médias obtidas a partir da soma da exploração dos objetos A1 e A2 (a) Médias obtidas através do tempo de exploração do objeto A3 (b) e B (c). Médias obtidas através da razão entre a exploração do objeto B menos a exploração do objeto já conhecido (A3) e a exploração de B mais a exploração de A3 (d). Grupo Controle (RC); Ração Hipercalórica (HC); Ração Hiperlipídica (HL); Ração Hiperproteica (HP); Restrição Alimentar (RA)
 $p < 0,05$ (*)

Fonte: do autor

Figura 7- Análise da exploração dos objetos A3 e B



Nota: Médias do tempo de exploração (segundos) do objeto A3 e B apresentadas pelos animais de cada grupo experimental. $p < 0,05$ (*). $p < 0,001$ (***).

Fonte: do autor

5.4 ANÁLISE DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E VIABILIDADE GESTACIONAL

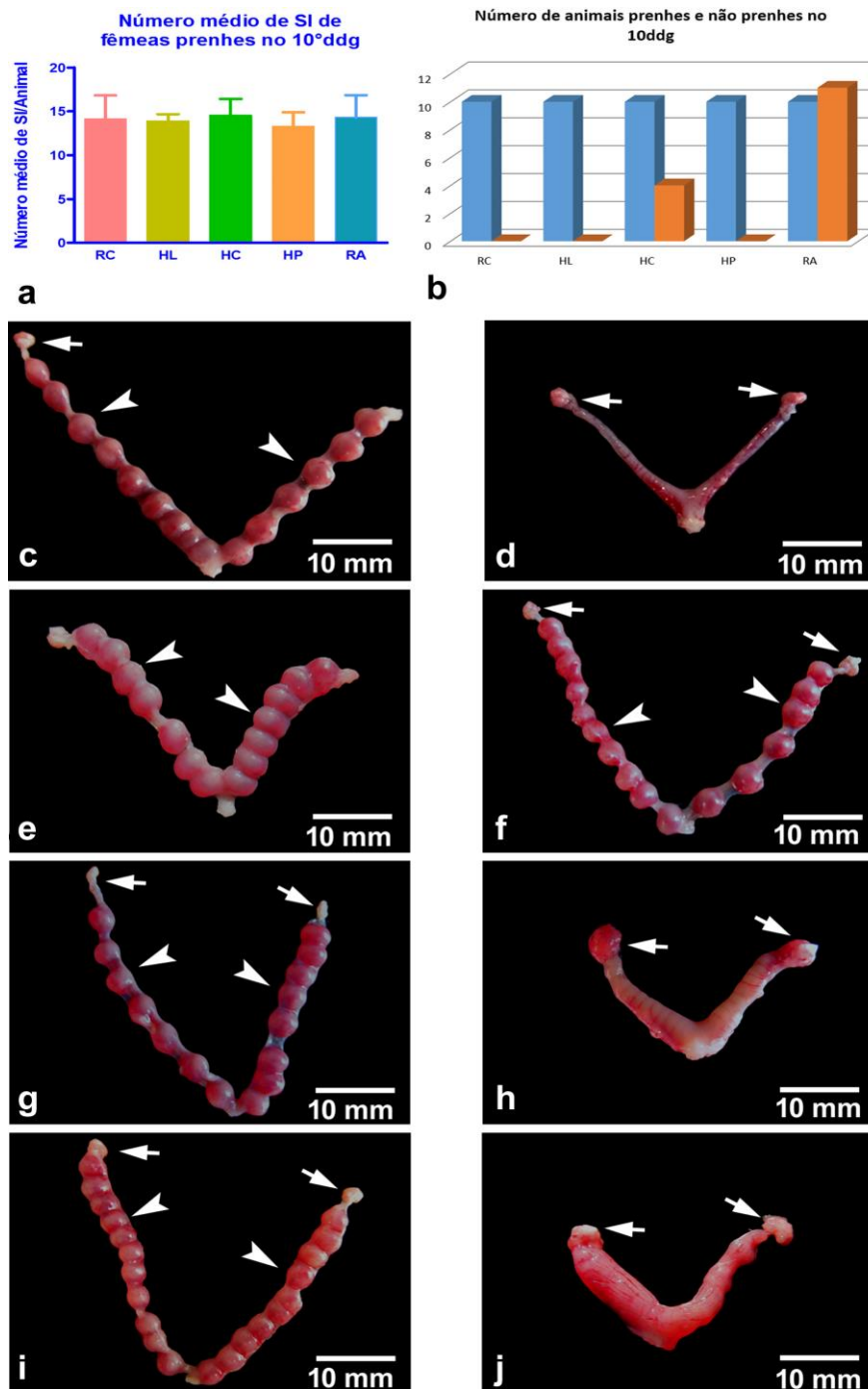
Os sítios de implantação de todos os animais foram analisados macroscopicamente e contados para avaliação da viabilidade gestacional. Foi realizada a média de sítios de implantação em fêmeas que apresentavam sítios no útero após laparotomia (**Figura 8a**). Os animais controle possuíam em média 14,15 sítios de implantação. Os animais dos grupos HL e HC possuíam número médio de sítios de implantação de 13,92 e 14,54, respectivamente, o grupo HP apresentou número médio de 13,27 e o grupo RA 14,30 sítios por fêmea.

Na maioria dos animais foram observados sítios de implantação embrionários após a eutanásia, sendo assim, estes animais foram diagnosticados como gestantes no 10º ddg. No entanto, em 4 animais do grupo HC e em 11 animais do grupo RA (**Figura 8b**) não foram observados sítios de implantação embrionária, ou seja, os

animais não estavam prenhes no 10^o ddg como esperado, mesmo tendo sido observado o tampão vaginal no 1^oddg.

A análise macroscópica dos cornos uterinos de todos os animais demonstrou que os animais controle possuíam sítios de implantação de aspecto normal, como esperado, **(Figura 8c)** formando uma estrutura do tipo “colar de contas”, característico do útero de murinos prenhes e diferente de um útero virgem **(Figura 8d)**. Os cornos uterinos de animais dos grupos HL e HP apresentaram aspecto semelhante aos animais controle **(Figura 8e e 8f)**. A maioria dos animais do grupo HC, em contrapartida, apresentaram sítios de implantação de aspecto normal **(Figura 8g)**, enquanto quatro destes animais não estavam prenhes. Os cornos uterinos destes animais do grupo HC não tinham o mesmo aspecto observado em útero de camundongo virgem **(Figura 8d)**, no entanto, não apresentavam sítios de implantação e tinham aspecto de inchados quando comparados ao útero de camundongos virgens **(Figura 8h)**. Interessantemente, nos animais submetidos à restrição alimentar (RA), 15 dos 26 animais submetidos a este tratamento tinham úteros gestantes de aspecto normal **(Figura 8i)** e os outros 11 restantes não apresentaram sítios de implantação embrionária e tinham sempre aspectos semelhantes ao observado nos úteros não prenhes de animais do grupo HC **(Figura 8j)**.

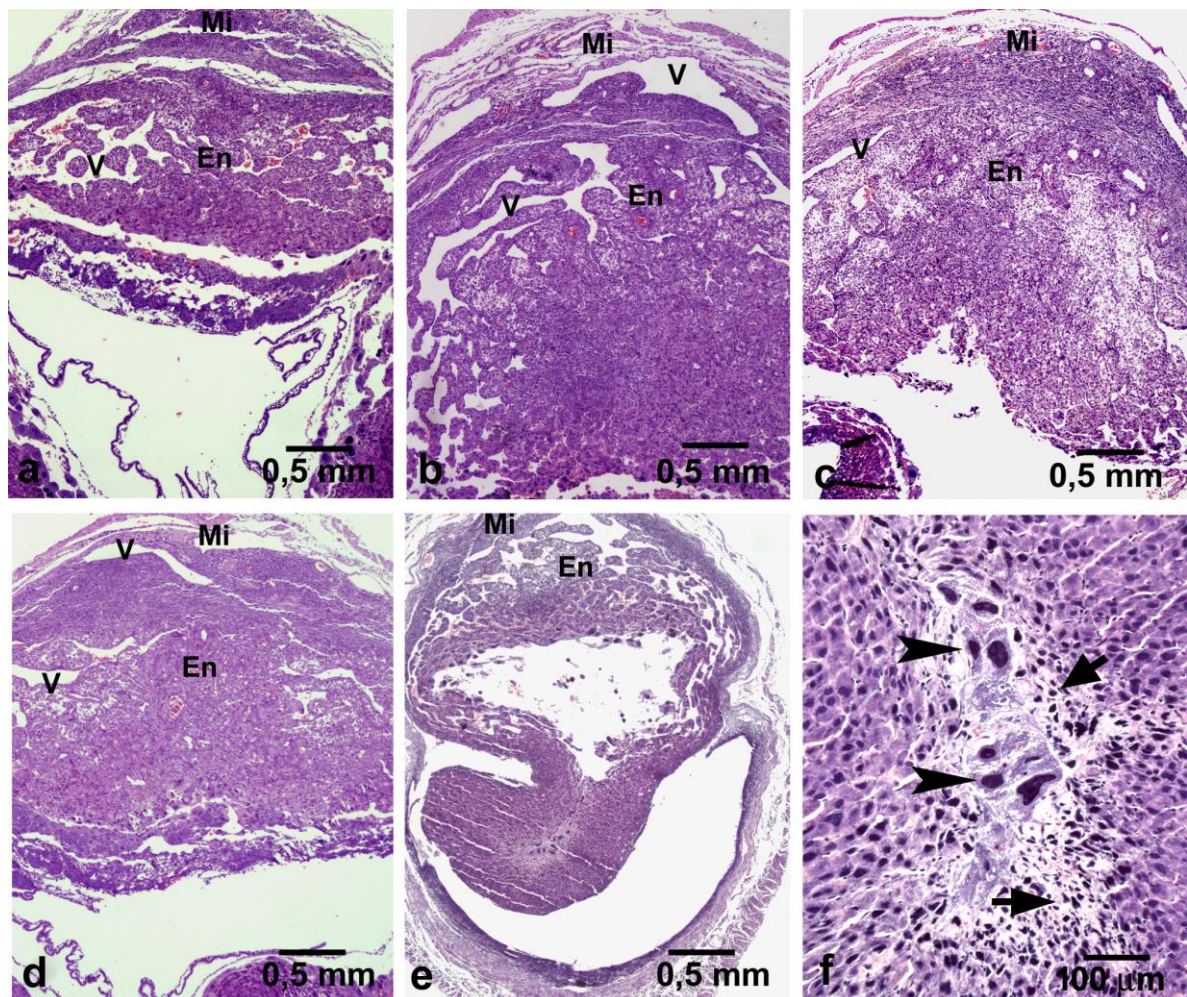
Figura 8- Média do número de Sítios de Implantação por animal (SI/animal)



Nota: Ração Controle (RC), Hiperproteíca (HP), Hipercalórica (HC) e Restrição (RA) (7a). Número de animais prenhes (azul) e não prenhes (vermelho) observados após 10 dias de cada dieta (7b). Imagens macroscópicas de úteros de camundongos prenhes no 10ºddg; RC (7c); Virgem (7d); HP (7e); HL (7f); HC (7g) e (7h); RA (7i e 7j). Ovários (setas). Sítios de implantação (cabeças de setas).

Fonte: do autor.

Figura 9: Fotomicrografias dos sítios de implantação corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE)



Nota: RC (8a); HP (8b); HL (8c); HC (8d); RA (8e e 8f). Notar a morfologia dos sítios de animais HP (8b), HL (8c), HC (8d) semelhante ao RC (8a) e sítio de implantação em reabsorção de fêmea RA (8e e 8f). Núcleos picnóticos (setas) e Células Trofoblásticas Gigantes (CTG) com aspecto senescente (cabeças de seta).
Mi. Miométrio V. Vasos sanguíneos, En. Endométrio. Hematoxilina e Eosina.

Fonte: do autor

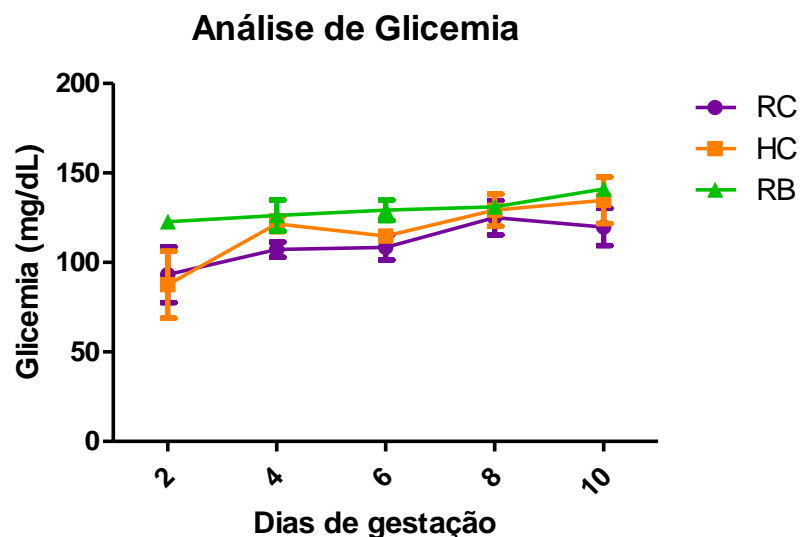
A análise microscópica dos sítios de implantação mostrou que os sítios coletados dos animais RC (**Figura 9a**), HP (**9b**), HL (**9c**) e HC (**9d**) tinham morfologia aparentemente semelhante, com grande quantidade de células e vasos sanguíneos no endométrio, onde esses vasos sanguíneos formavam trabéculas por onde passa o sangue materno. Em nenhum dos sítios analisados destes animais foram notados indícios de morte embrionária.

Embora não tenha sido possível observar, macroscopicamente, sítios de implantação contendo embriões em reabsorção nas fêmeas RA prenhes no 10º ddg (**Figura 8i**), a análise microscópica da morfologia dos sítios desses animais revelou que vários destes continham embriões em processo de reabsorção (**Figura 9e e 9f**). Além disso, foi corriqueira a observação de Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs), com núcleo picnótico e/ou corados fortemente pela hematoxilina, indicativos de morte celular (**Figura 9f**).

Como comentado anteriormente, o grupo HC, além do RA, possuíam fêmeas que, mesmo após ter sido observado o *plug vaginal*, não estavam prenhes quando sacrificadas no 10ºddg (**Figura 8h**).

Para verificar se a glicemia poderia ser um fator envolvido com a ausência de prenhez no 10ºddg para parte das fêmeas do grupo HC, foi realizada a análise da glicemia de fêmeas prenhes deste grupo nos dias 2, 4, 6, 8 e 10º de gestação. A análise da média de glicemia mostrou não haver diferença significativa entre o grupo HC em relação ao grupo controle ($p>0,05$), revelando que a ração hipercalórica, fornecida do 1º ao 10ºddg, não foi capaz de promover alteração na glicemia de fêmeas prenhes (**Figura 10**).

Figura 10- Gráfico da análise de glicemia



Nota: Gráfico exibindo a glicemia de fêmeas prenhes dos grupos controle (RC), hipercalórica (HC) e, por último de fêmeas prenhes que consumiram ração normalmente utilizada no Biotério central da UNIFAL-MG.

Fonte: do autor

Para fornecer mais uma comprovação da qualidade da ração controle fornecida aos animais deste estudo, foi realizada a comparação da glicemia de fêmeas prenhes que consumiram a ração controle (RC) em relação a fêmeas prenhes que consumiram a ração normalmente utilizada no Biotério Central da Universidade federal de Alfenas (RB). A análise mostrou que os animais tratados com RC tinham níveis glicêmicos semelhantes àqueles tratados com RB ($p>0,05$).

A análise estatística mostrou que com o passar dos dias ocorreu aumento dos níveis glicêmicos em todos os grupos ($p>0,001$). Demonstrando assim que, com o avanço da gestação ocorreu aumento do índice glicêmico tanto nas fêmeas HC quanto nas fêmeas RC e RB.

5.5 ANÁLISE CITOQUÍMICA, ESTEREOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS CÉLULAS UNK

5.5.1 Análise citoquímica e estereológica

À semelhança do descrito por Paffaro e seus colaboradores (2003), em nossos estudos foram observadas células fortemente reativas para lectina DBA distribuídas em três regiões localizadas no lado mesometrial dos sítios de implantação embrionária de camundongos RC (**Figura 11a**). Portanto, nesses animais foi possível identificar todos os 4 subtipos descritos por Paffaro Jr e colaboradores (2003) no 10º ddg. As células uNK do subtipo I se encontravam distribuídas preferencialmente na região 1 (R1) (**Figura 11b**), eram pequenas e arredondadas com morfologia semelhante a um linfócito, em seus núcleos predominava a heterocromatina, tinham citoplasma restrito e exibiam suas superfícies reativas à lectina DBA (**Figura 11e**).

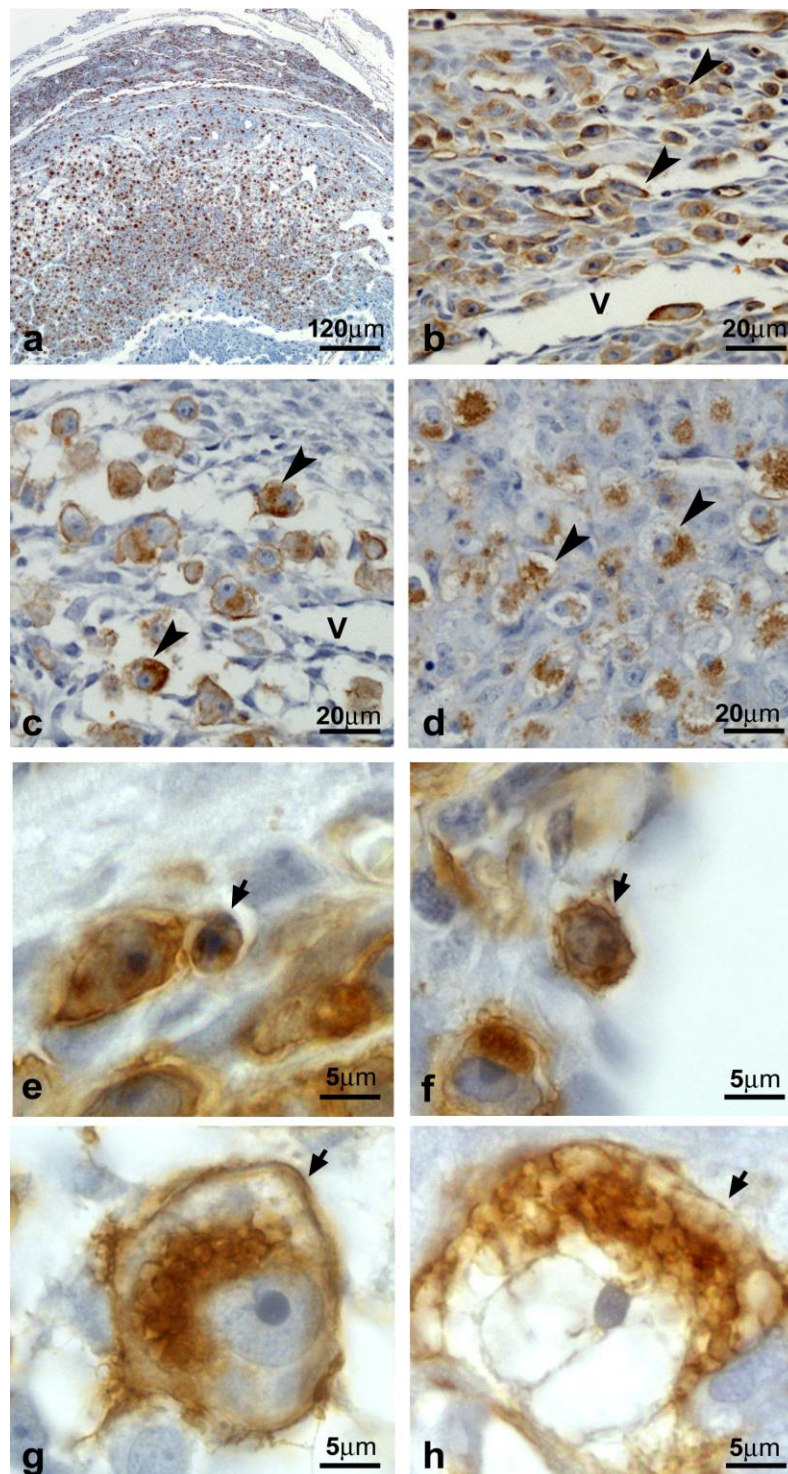
Na região 1, foram encontradas ainda muitas células do subtipo II (**Figura 11b**), e eram ligeiramente maiores que as do subtipo I e possuíam poucos grânulos citoplasmáticos que assim como suas superfícies eram reativos a lectina DBA (**Figura 11f**).

As células uNK do subtipo III, forma morfológicamente mais diferenciada, localizava-se predominantemente na região 2 (R2) do sítio de implantação (**Figura 11c**). Tais células, eram bem maiores, com núcleo onde predominava a eucromatina e seu nucléolo era evidente, sua superfície e numerosos grânulos citoplasmáticos eram reativos a lectina DBA (**Figura 11g**).

Já o subtipo IV, forma morfológicamente senescente das células uNK, foi encontrada em maior número na região 3 (R3) destes animais (**Figura 11d**), Tais células tinham conteúdo granular variável, que quando presentes reagiram fortemente com a lectina DBA, seu citoplasma possuía regiões que lembravam extração citoplasmática e a reação de lectina DBA em suas superfícies continuava a ser observada (**Figura 11h**).

Adicionalmente aos resultados obtidos por Paffaro Jr et. al. (2003), que trabalharam caracterizando espaço-temporalmente as células uNK de camundongos normais prenhes, em nossas análises um quinto subtipo de célula uNK pôde ser observado. Este subtipo de uNK apresentava marcação muito irregular para lectina DBA em suas membranas ou era totalmente ausente, em alguns grupos seus grânulos possuíam aspecto de estarem vazios e seu citoplasma não apresentava sinais de extração (**Figura 12, 13 e 14**). Por ser um subtipo que possuía características heterogêneas àquelas observadas nas uNK de camundongos prenhes normais o mesmo recebeu a denominação de uNK alterada (uNKa) nomenclatura semelhante àquela adotada por Lippe (2007) e Zavan (2011).

Figura 11- Subtipos de células uNK DBA⁺.



Nota: Região mesometrial do sítio de implantação (SI) (a). Região 1 do SI (b). Região 2 (c). Região 3 (d). Subtipos I (e), 2 (f), 3 (g) e 4 (h) de células uNK. Células reativas à lectina DBA (Cabeças de Seta). Subtipos de células uNK DBA reativas (Setas). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor

5.5.1.1 Análise Estereológica do grupo Hiperlipídica (HL)

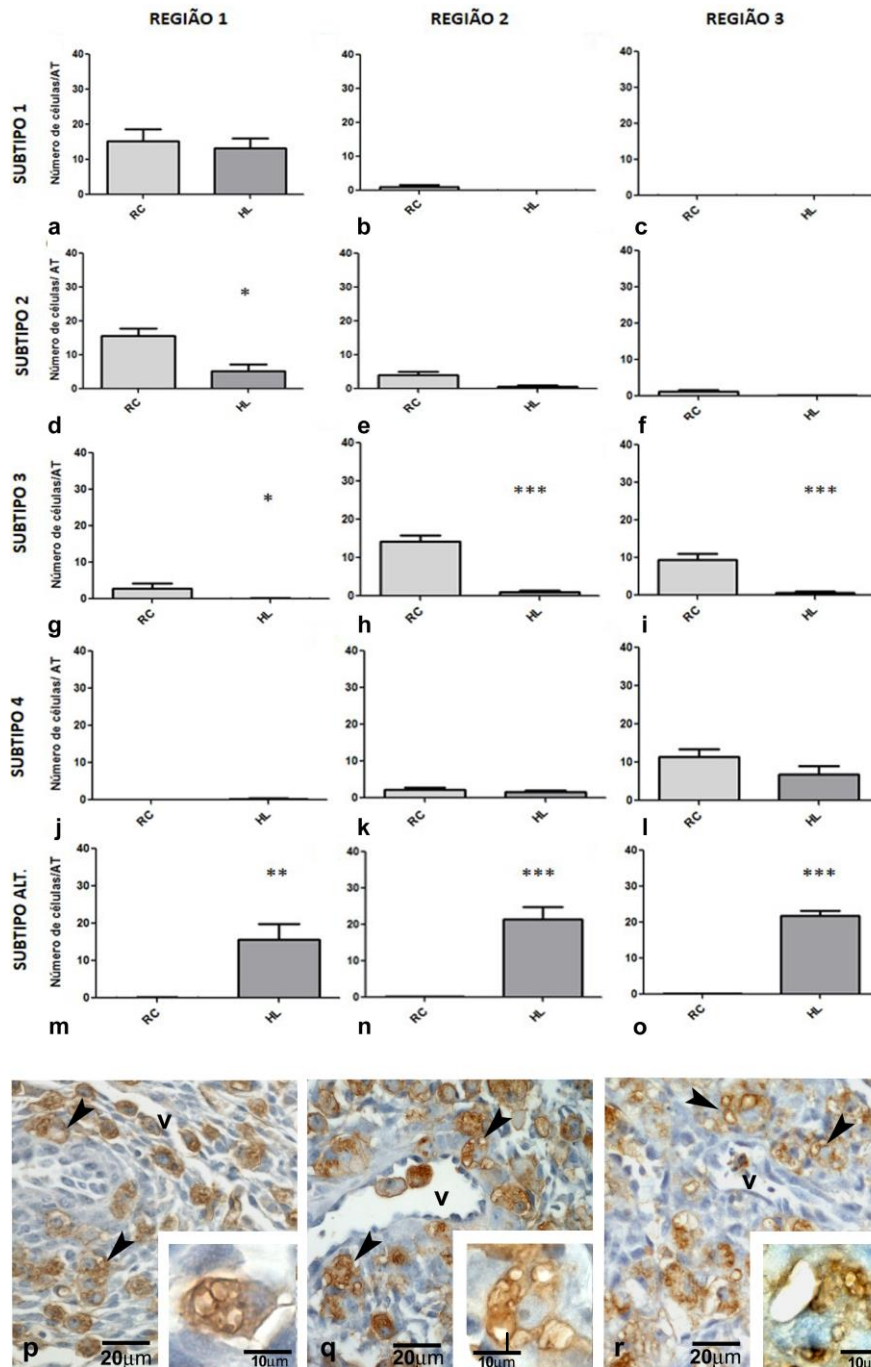
No grupo HL foi possível evidenciar que o subtipo I de células uNK, encontrava-se em número semelhante (13,1 células/AT) ao controle (15,2 células/AT) na região 1 (R1) (**Figuras 12a**). Semelhante ao observado em R1, na região 2 não houve diferença no número de células do subtipo I quando comparados animais HL (0,08 células/AT) em relação ao controle (1 células/AT) (**Figura 12b**). Na região 3 (R3), novamente a quantidade média de células do subtipo I nos animais HL (0,04 células /AT) e controle (0,08 células/AT) eram estatisticamente iguais (**Figura 12c**).

Diferente das células uNK do subtipo I, o número de células do subtipo II em R1 era bastante menor no grupo HL (5,1 células/AT) que no grupo controle (15,6 células/AT) ($p < 0,01$) (**Figura 12d e 12p**). Entretanto, a quantidade desse subtipo na R2 de HL (0,6 células/AT) foi estatisticamente semelhante ao observado no grupo RC (4 células/AT) (**Figura 12e**). O mesmo foi observado na R3, onde as fêmeas do Grupo HL apresentaram 0,2 células/AT e o grupo RC 1,1 células/AT (**Figura 12f**).

As células uNK do subtipo III no grupo HL foram encontradas em número reduzido quando comparado ao controle nas 3 regiões dos sítios de implantação. Em R1 o grupo HL apresentou 0,1 células/AT, enquanto o grupo RC possuía 2,8 células/AT ($p < 0,05$) (**Figura 12g**). Na região 2, os sítios de implantação das fêmeas HL apresentaram 0,9 células/AT, número estatisticamente diferente ao observado no grupo controle (14,2 células /AT) ($p < 0,001$) (**Figura 12h**). Por fim, na região 3 foi observado 0,6 células/AT, enquanto no grupo controle o valor foi de 9,4 células/AT ($p < 0,001$) (**Figura 12i**).

O subtipo IV dos sítios de implantação das fêmeas HL não estavam alterados em número quando comparados ao grupo RC. No grupo RC foi observado 0,02 células/AT em R1, enquanto HL exibiu 0,2 células/AT (**Figura 12j**). O mesmo foi observado em R2, onde RC apresentou 2,3 células/AT e HL 1,7 células/AT (**Figura 12k**) e em R3, o grupo HL exibiu valor de 6,9 células/AT e o grupo RC 11,5 células/AT (**Figura 12l**).

Figura 12- Distribuição dos subtipos de células uNK DBA⁺ do grupo



Nota: Distribuição dos subtipos de células uNK por Área Teste (AT= $4.10^4 \mu\text{m}^2$) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas com dieta controle (RC) e Hiperlipídica (HL). Subtipo I (a-c), subtipo II (d-f), subtipo III (g-i), subtipo IV (j-l) e uNK alterada (uNKa) (m-o). Fotomicrografias dos sítios de implantação de camundongos no 10^o ddg submetidos à citoquímica de lectina DBA. Região 1 (p); Região 2 (q) e região 3 (r) de camundongo HL. Notar predominância de células uNKa (cabeças de setas) em R1, R2 e R3 e o aspecto de vazios dos grânulos citoplasmáticos dessas células (detalhes na direita inferior) (p, q e r). Vaso sanguíneo (V). $p < 0.05$ (*). $p < 0.01$ (**). $p < 0.001$ (***). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Com relação ao subtipo alterado de célula uNK (uNKa) foi observado que no grupo HL essas células encontravam-se em número maior (15,6 células/AT) em relação ao controle (0,1 células/AT) (**Figura 12m**) ($p < 0,01$). O mesmo aspecto foi observado na região 2 (HL 21,3 células/AT e RC 0,2 células/AT) ($p < 0,001$) (**Figura 12m**) e na região 3 (HL 21,9 células/AT e RC 0,8 células/AT) ($p < 0,001$) (**Figura 12n**). A expressiva quantidade de células uNKa, com grânulos aparentemente vazios, pôde ser claramente observada em microscopia de luz nas regiões 1, 2 e 3 (**Figura 12p, 12q e 12r**, respectivamente).

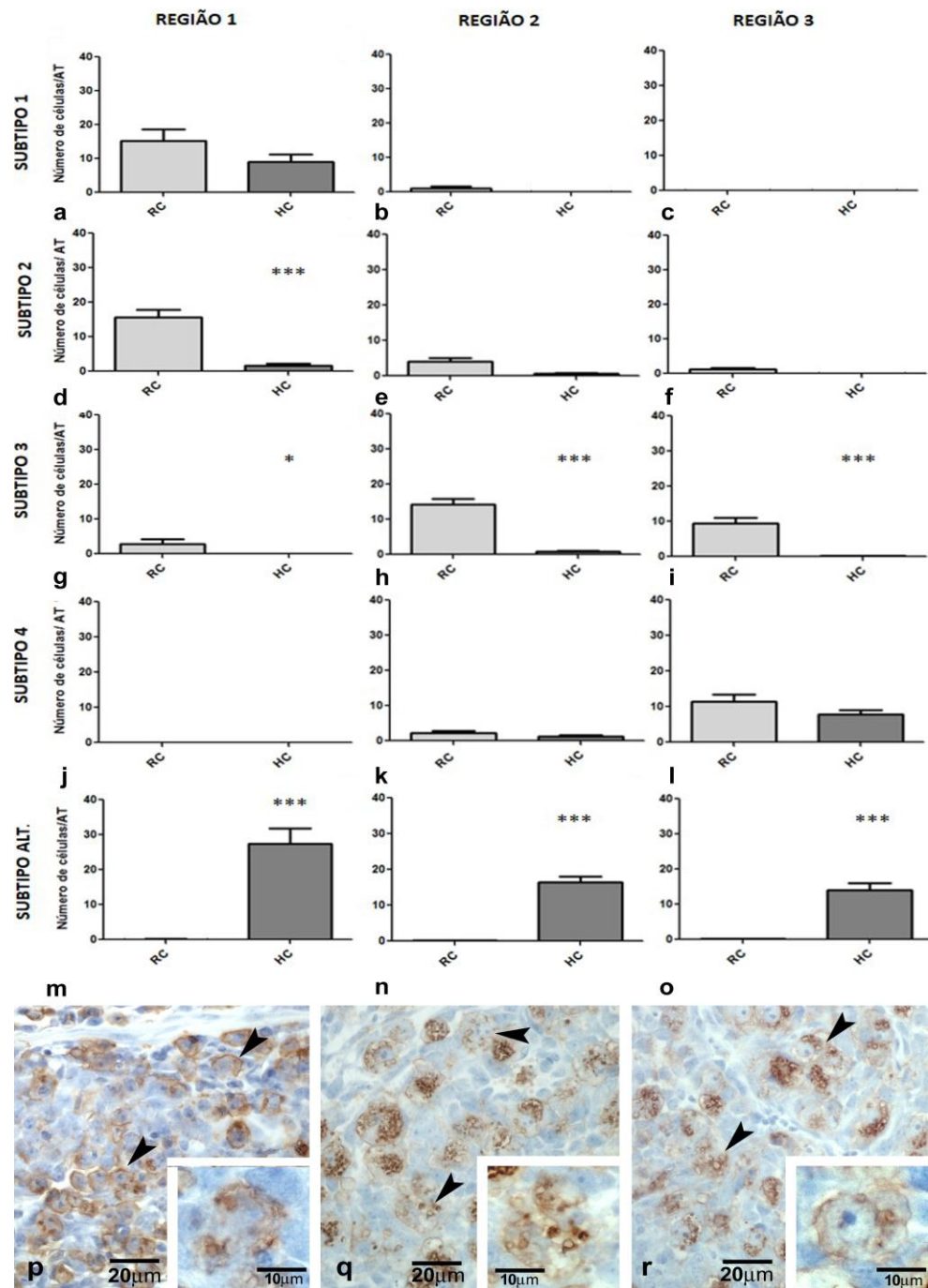
5.5.1.2 Análise Estereológica do grupo Hipercalórica (HC)

As fêmeas do grupo HC não apresentaram alteração no número de células uNK do subtipo I em R1 (9 células/AT) quando comparadas ao grupo RC (15,2 células/AT). Na região 2 de HC também não foi observada alteração deste subtipo (0,07 células/AT) em relação a mesma região no grupo controle (1 células/AT). Igualmente as regiões anteriores, HC não apresentou alteração quanto a quantidade de células do subtipo I (0,04 células/AT) em relação ao grupo RC (0,09 células/AT) na região 3 dos sítios de implantação (**Figura 13a e 13 p**).

A análise do subtipo II revelou que as fêmeas HC apresentaram menor número deste subtipo (1,6 células/AT) em R1, quando comparado com o grupo RC (15,7 células/AT) ($p < 0,001$) (**Figura 13d e 13p**). Já na região 2, as células do subtipo II de fêmeas HC (0,6 células/AT) tinham incidência semelhante àquelas do grupo controle (4 células/AT) (**Figura 13e e 13q**). De modo semelhante à R2, na R3 não foram observadas alterações estatisticamente significativas entre o grupo HC (0,04 células/AT) e RC (1,15 células/AT) (**Figura 13f e 13r**).

O número de células uNK do subtipo III nas fêmeas HC na região 1 era significativamente menor (0,02 células/AT) em relação ao grupo controle na mesma região (2,9 células/AT) ($p < 0,05$) (**Figura 13g e 13p**). Além da redução do subtipo III em R1 das fêmeas HC, foi observado, ainda, redução significativa do número deste subtipo em R2 (0,8 células/AT) (**Figura 13h e 13q**) e R3 (0,16 células/AT) (**Figura 13i e 13r**), quando comparado às regiões 2 (14,2 células/AT) e 3 (9,4 células/AT) de RC ($p < 0,001$).

Figura 13- Distribuição dos subtipos de células uNK DBA⁺ do grupo HC



Nota: Distribuição dos subtipos de células uNK por Área Teste (AT= $4.10^4 \mu\text{m}^2$) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas com dieta controle (RC) e Hipercalórica (HC). Subtipo I (a-c), subtipo II (d-f), subtipo III (g-i), subtipo IV (j-l) e uNK alterada (uNKa) (m-o). Fotomicrografias dos sítios de implantação de camundongos no 10º ddg submetidos à citoquímica de lectina DBA Região 1 (p); Região 2 (q) e região 3 (r) de camundongo HC. Notar predominância de células uNKa (cabeças de setas) em R1, R2 e R3 e o aspecto de vazios dos grânulos dessas células (detalhes na direita inferior) (p, q e r). $p < 0.05$ (*). $p < 0.01$ (**). $p < 0.001$ (***). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Com relação ao subtipo IV, este não apresentou alterações significativas em R1 (0 células/AT) (**Figura 13j e 13p**), R2 (1,2 células/AT) (**Figura 13k e 13q**) e R3 (7,8 células/AT) (**Figura 13l e 13r**) em relação às fêmeas RC, as quais apresentaram número médio de 0,02 células/AT na R1, 2,3 células/AT na R2 e 11,5 células na R3. A análise estereológica das células uNK DBA⁺ das fêmeas HC mostrou que o número das uNKa aumentou significativamente na R1 (27,4 células/AT) quando comparado às fêmeas RC nas quais esse subtipo alterado era quase ausente (0,13 células/AT) ($p < 0,001$) (**Figura 13m e 13p**). Grande quantidade deste subtipo também foi observada na região 2 dos sítios de implantação do grupo HC (16,4 células/AT) (**Figura 13n e 13q**) e na região 3 (14 células/AT) (**Figura 13o e 13r**), quando comparado às regiões 2 (0,2 células/AT) e 3 (0,2 células/AT) de RC ($p < 0,001$).

Foi realizada adicionalmente a comparação por meio de teste estatístico entre a quantidade total de células uNKa de camundongos HL e HC e nossos resultados indicam que ambos os grupos possuíam a mesma quantidade desse subtipo de uNK (HL=18,9 células/AT e HC=18,5 células/AT ($p < 0,01$)).

5.5.1.3 Análise Estereológica do grupo Hiperproteica (HP)

Em nossas análises de sítios de implantação das fêmeas prenhes que consumiram dieta rica em proteína (HP) não foi constatada modificação no número de células uNK DBA⁺ do subtipo I nas regiões 1 (10,9 células/AT) (**Figura 14a**), 2 (0,16 células/AT) (**Figura 14b**) e 3 (0,04 células/AT) (**Figura 14c**) em comparação às regiões 1 (15,2 células/AT), 2 (1 células/AT) e 3 (0,09 células/AT) do grupo RC. O mesmo ocorreu para o subtipo II, o qual apresentou valores estatisticamente semelhantes em R1 (11,8 células/AT) (**Figura 14d**), R2 (2,2 células/AT) (**Figura 14e**) e R3 (1,1 células/AT) (**Figura 14f**), quando comparado a R1 (15,7 células/AT), R2 (4 células/AT) e R3 (1,2 células/AT) das fêmeas do grupo controle.

O número de células do subtipo III não estava alterado na R1 nos sítios de implantação das fêmeas HP (1,6 células/AT) em relação a R1 de RC (2,9 células/AT) (**Figura 14g**). Todavia, na região 2, as fêmeas do grupo HP possuíam quantidade

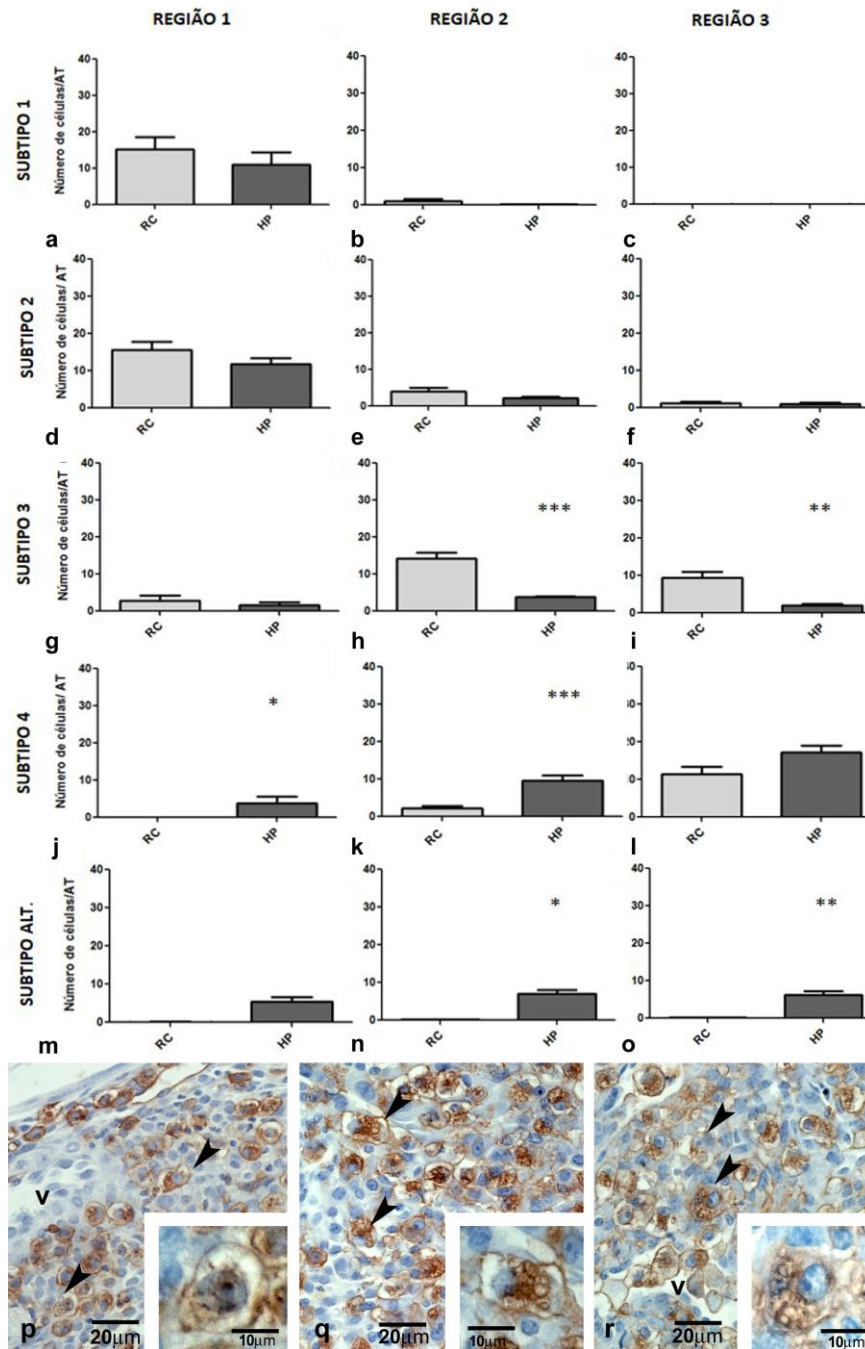
significativamente menor do subtipo III (3,8 células/AT) ($p < 0,001$) em relação ao número de células encontradas na R2 do grupo controle (14,2 células/AT) (**Figura 14h**), como claramente observado em microscopia de luz (**Figura 14q**). Assim como na região 2, na R3 de HP também foi observada diminuição deste subtipo (2,4 células/AT) quando comparado ao controle (9,4 células/AT) (**Figura 14i e 14r**).

No grupo HP foram observadas alterações, também no subtipo IV de células uNK DBA⁺. Na região 1 dos sítios de implantação das fêmeas HP foi constatado um aumento significativo deste subtipo (3,8 células/AT) quando comparado a sua quantidade observada na mesma região no grupo controle (0,02 células/AT) (**Figura 14j e 14p**) ($p < 0,05$). Esta alteração também foi observada nas demais regiões analisadas, uma vez que as fêmeas HP apresentaram em R2 (9,6 células/AT) e em R3 (17,2 células/AT, enquanto as fêmeas do grupo RC exibiram valores de (2,3 células/AT) em R2 e (11,5 células/AT) em R3.

O grupo HP também apresentou células uNKa, nas regiões 2 e 3 dos sítios de implantação. Na região 1 a quantidade média de uNKa nas fêmeas HP (5,3 células/AT) não foi estatisticamente diferente da observada no grupo controle (0,13 células/AT) (**Figura 14m e 14p**). No entanto, números maiores de células uNKa foram observados na região 2 (7 células/AT) e 3 (6,2 células/AT) de animais HP em relação ao número destas células na região 2 (0,2 células/AT) e 3 (0,18 células/AT) de RC ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) (**Figuras 14n e q; 14o e 14r**).

Além disso, realizamos a comparação por meio de teste estatístico entre a quantidade total de células uNKa de camundongos HP e camundongos HL e HC. Após o teste, foi constatado que os sítios de implantação de camundongos HP continham menor número de células uNKa (5,9 células/AT) que ambos HL (18,9 células/AT) ($p < 0,001$) e HC (18,5 células/AT) ($p < 0,01$).

Figura 14- Distribuição dos subtipos de células uNK DBA⁺ do grupo HP



Nota: Distribuição dos subtipos de células uNK por Área Teste (AT= $4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas com dieta controle (RC) e Hiperproteica (HP). Subtipo I (a-c), subtipo II (d-f), subtipo III (g-i), subtipo IV (j-l) e uNK alterada (uNKa) (m-o). Fotomicrografias dos sítios de implantação de camundongos no 10^o dgd submetidos à citoquímica de lectina DBA Região 1 (p); Região 2 (q) e região 3 (r) de camundongo HP. Notar células uNK do subtipo IV na R1 (cabeças de setas) e detalhe na direita inferior (p) e as células uNKa em R2 e R3 (cabeças de setas), bem como, o aspecto de vazios dos grânulos dessas células (detalhes na direita inferior) (q e r). $p < 0.05$ (*). $p < 0.01$ (**). $p < 0.001$ (***). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte- do autor.

5.5.1.4 Análise Estereológica do grupo de Restrição Alimentar (RA)

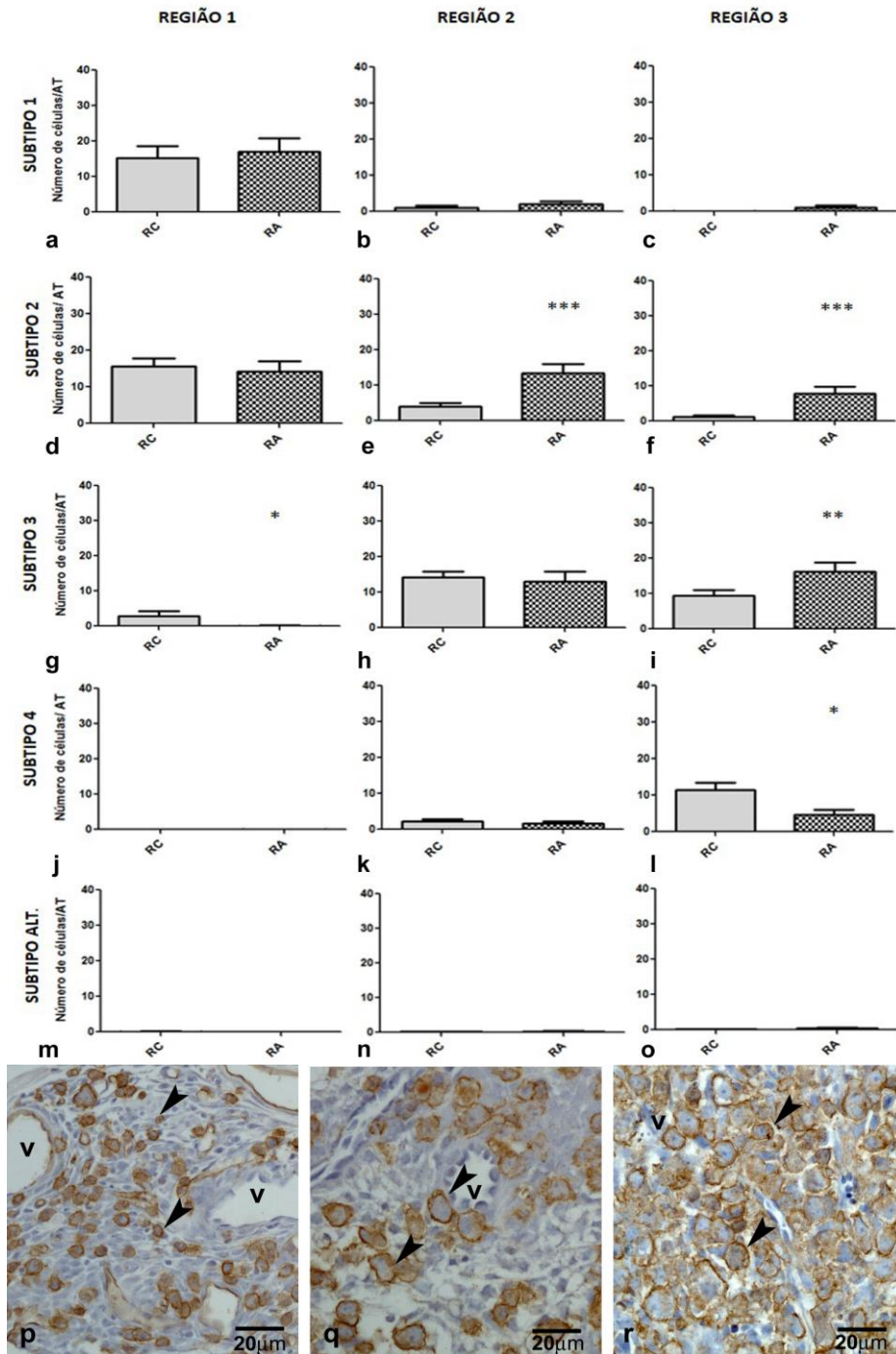
A análise estereológica dos sítios de implantação das fêmeas RA mostrou que o subtipo I na R1 (17,1 células/AT), R2 (2 células/AT) e R3 (1 células/AT) não tinham incidência diferente do observado nas regiões R1 (15,2 células/AT), R2 (1,02 células/AT) e R3 (0,1 células/AT) do grupo controle (**Figuras 15a, 15b e 15c**).

O subtipo II de células uNK DBA⁺ foi observado em quantidade estatisticamente semelhante na região 1 nas fêmeas RA (14,3 células/AT) e RC (15,7 células/AT) (**Figura 15d**). Entretanto, na região 2, foi possível constatar um aumento em número deste subtipo em RA (13,5 células/AT) comparado ao grupo controle (4 células/AT) ($p < 0,001$) (**Figura 15e**). O mesmo pode ser observado na região 3, região em que foi observado maior número de células do subtipo II (8 células/AT) em relação ao controle (1,15 células/AT) (**Figura 15f**).

Com relação ao subtipo III observamos um menor número deste subtipo em R1 nas fêmeas RA (0,11 células/AT) quando comparado à mesma região do grupo RC (2,9 células/AT) ($p < 0,05$) (**Figura 15g e 15p**). Já na região 2 não ocorreu diferença significativa na quantidade de células deste subtipo do grupo RA (13 células/AT) em relação ao controle (14,2 células/AT) (**Figura 15h e 15q**). Diferente do observado nas regiões 1 e 2 de RA, a região 3 o subtipo III aumentou significativamente em número (16,3 células/AT) comparativamente ao grupo RC (9,4 células/AT) (**Figura 15i**). Este aumento de subtipo III na região 3 em RA pôde ser claramente evidenciado em microscopia de luz (**Figura 15r**).

Quando analisado o subtipo IV de células uNK DBA⁺ foi possível verificar que nas fêmeas RA não ocorreram diferenças significativas nas regiões 1 (0,04 células/AT) e 2 (2,3 células/AT) em relação as regiões 1 (0,02 células/AT) e 2 (2,3 células/AT) do grupo RC (**Figura 15j e 15k**). Entretanto, mais próximo ao embrião, ou seja na região 3, o grupo RA tinha um menor número de células do subtipo IV (4,6 células/AT), quando comparado ao grupo controle (11,5 células/AT) (**Figura 15l**). Essa redução pôde ser facilmente observada em microscopia de luz (**Figura 15r**).

Figura 15- Distribuição dos subtipos de células uNK DBA⁺ do grupo RA



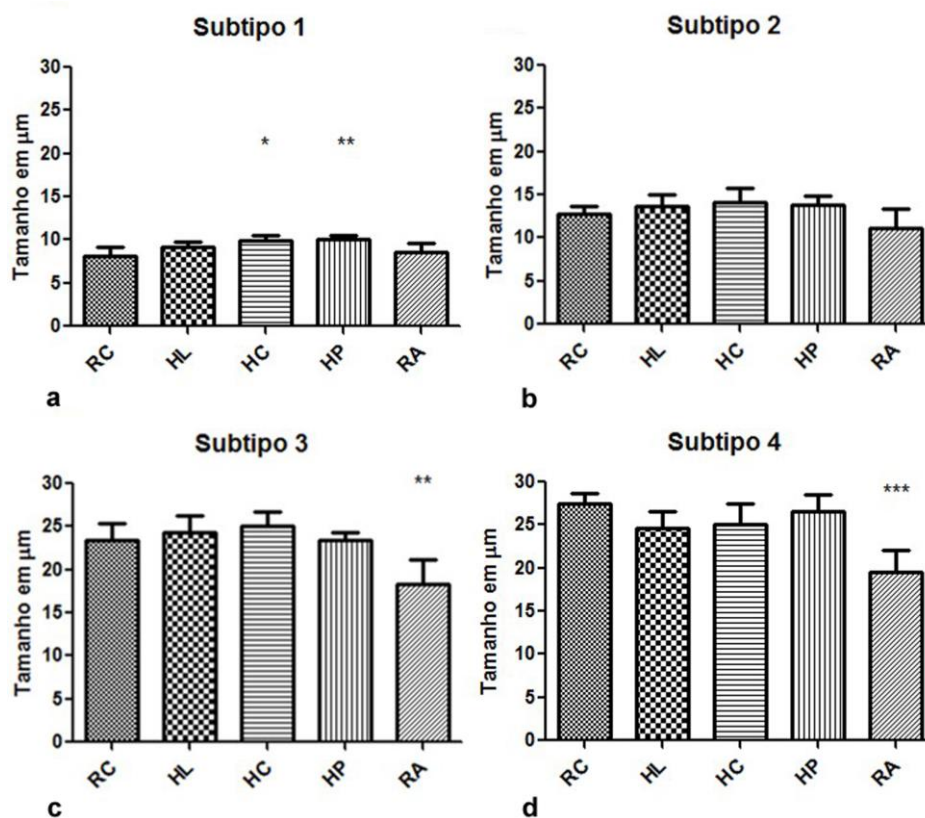
Nota: Distribuição dos subtipos de células uNK por Área Teste (AT= 4.10⁴μm²) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas com dieta controle (RC) e Restrição Alimentar (RA). Subtipo I (a-c), subtipo II (d-f), subtipo III (g-i), subtipo IV (j-l) e uNK alterada (uNKa) (m-o). Fotomicrografias dos sítios de implantação de camundongos no 10^o ddg submetidos à citoquímica de lectina DBA. Região 1 (p); Região 2 (q) e região 3 (r) de camundongo RA. Notar uNK DBA⁺ (cabeças de setas) do subtipo I na região 1 (p), do subtipo II na região 2 (q) e do subtipo III na região 3 (r). Vaso sanguíneo (V). p<0.05 (*). p<0.01 (**). p<0.001 (***). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

No grupo RA não foram observadas alterações significativas no número de uNKa em nenhuma das 3 regiões. Nas fêmeas RA, esse subtipo de uNK era tão raro (**Figura 15r**) (R1: 0 células/AT, R2: 0,3 células/AT e R3: 0,42 células/AT), quanto o observado nos animais RC (R1: 0,13 células/AT, R2: 0,2 células/AT e R3: 0,2 células/AT (**Figura 15m, 15n e 15o**).

5.5.2. Análise morfométrica

Figura 16- Análise morfométrica dos 4 subtipos de células uNK DBA reativos



Nota: Gráficos exibindo o tamanho médio (em μm) dos subtipos I (a), II (b), III (c) e IV (d) de células uNKDBA⁺ nos grupos controle (RC), Hiperlipídica (HL), Hipercalórica (HC), Hiperproteica (HP) e Restrição Alimentar (RA).

Fonte: do autor.

A realização da análise morfométrica dos 4 subtipos de células uNK DBA⁺ mostrou que no grupo HC (9,9µm) e HP (10,1µm) ocorreu um aumento no tamanho das células do subtipo I, em relação ao controle (8,1µm) ($p < 0,005$ e $p < 0,01$, respectivamente) (**Figura 16a**). Já o subtipo II não apresentou alteração de tamanho em nenhum dos grupos experimentais (**Figura 16b**), enquanto os subtipos III e IV exibiram tamanho celular menor no grupo RA (18,3 µm e 19,4µm, respectivamente) quando comparados aos subtipos III (23,5µm) e IV (27,5µm) do grupo RC ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) (**Figura 16c e 16d**).

5.6 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

5.6.1 Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo RC

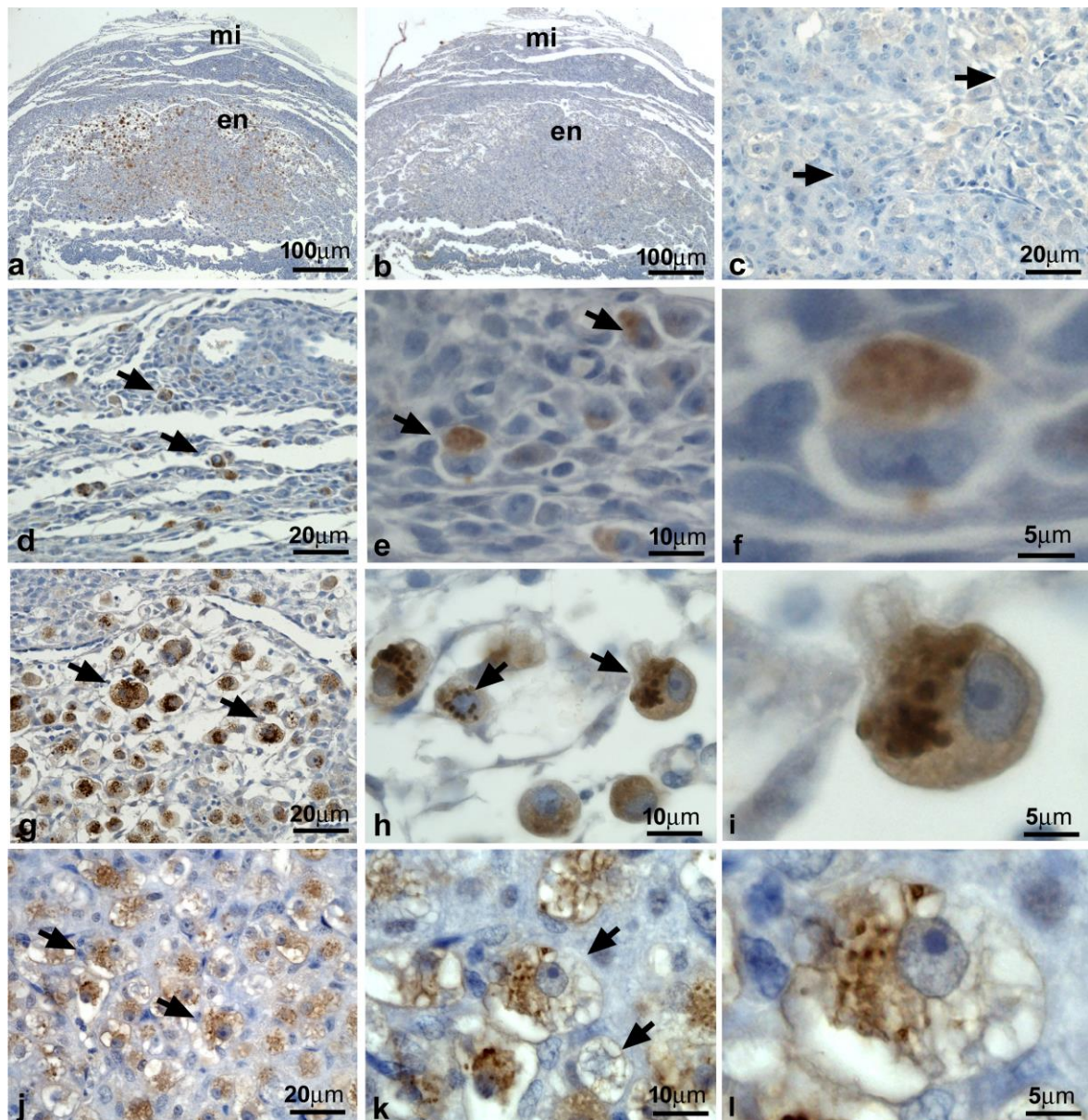
A análise imunocitoquímica para perforina mostrou que os sítios de implantação das fêmeas controle apresentaram células reativas à perforina no miométrio e, em maioria, na região de endométrio dos sítios de implantação (**Figura 17a**). Nos cortes histológicos de sítios de implantação de animais controle onde foi omitido o anticorpo primário anti-perforina (controle negativo) não foi observada nenhuma reação positiva (**figura 17b e 17c**)

Na região 1 dos sítios de implantação destes animais foram observadas células positivas para perforina (**Figura 17d**). A maioria destas células eram morfológicamente semelhantes ao tipo II de células uNK DBA⁺, ou seja, eram pequenas e apresentavam poucos grânulos citoplasmáticos que reagiam fortemente para o anticorpo anti-perforina (**Figura 17e e 17f**).

Semelhante ao encontrado na região I, na região II, foram observadas muitas células reativas para o anti-perforina (**Figura 17g**). No entanto, grande parte dessas células eram morfológicamente semelhantes às células uNK do subtipo III, ou seja, eram grandes, com núcleo e o nucléolo evidentes e grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (**Figura 17h**), os quais tinham seu conteúdo fortemente reativo para o anticorpo anti-perforina (**Figura 17i**).

Muitas células reativas para lectina DBA foram observadas na região 3 dos sítios de implantação destes animais (**Figura 17j**). Estas células Perforina⁺ apresentavam conteúdo granular variável, que quando presente reagia fortemente com o anticorpo anti-perforina (**Figura 17k**). Essas células apresentavam ainda citoplasma extraído e eram semelhantes às células uNK DBA⁺ do subtipo IV (**Figura 17l**).

Figura 17- Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo RC

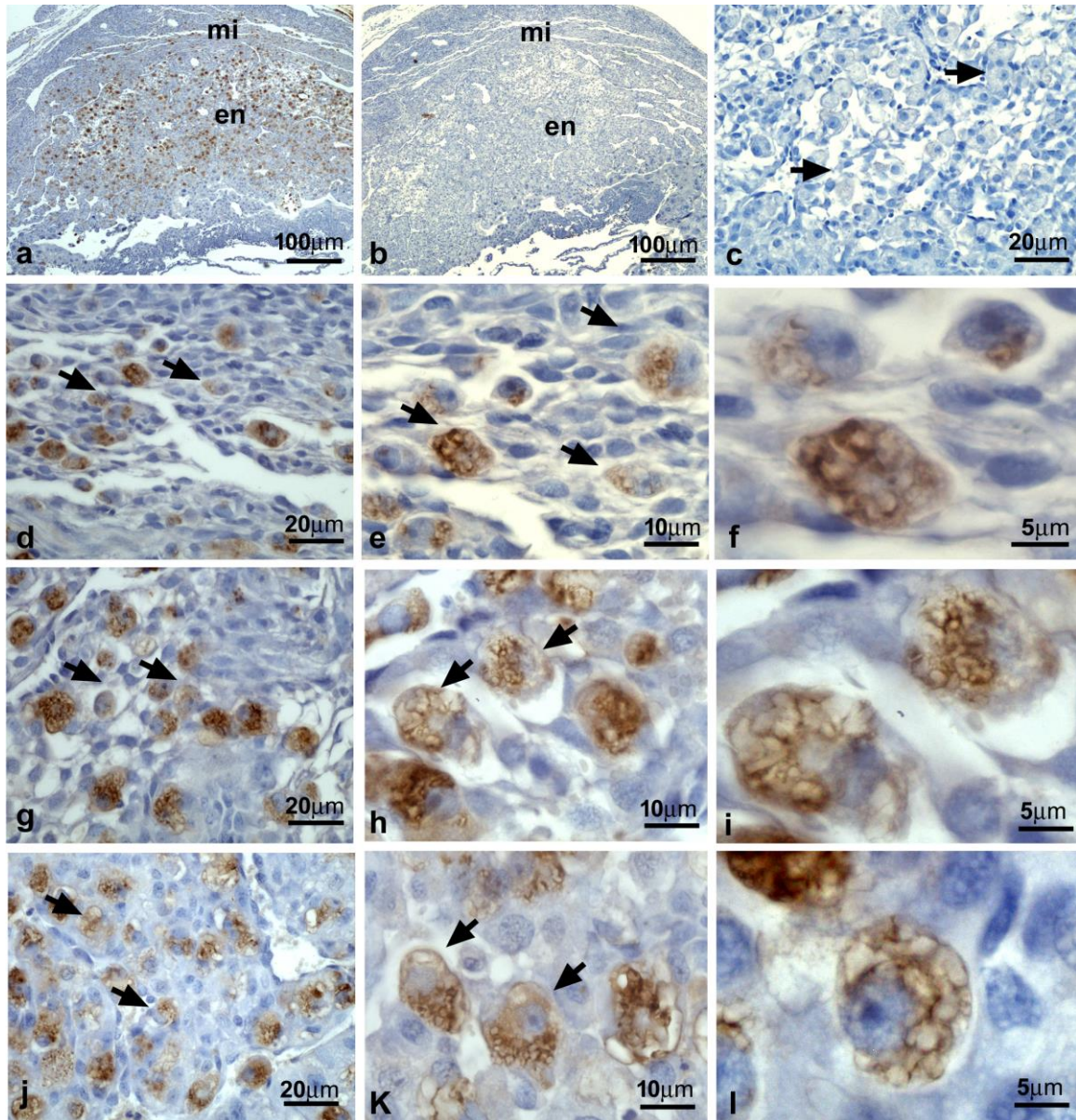


Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos RC no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para perforina (a-l). Região mesometrial mostrando células uNK Perforina⁺ (pontos castanhos) (a). Controle negativo para reação de imunocitoquímica para perforina (b e c). Região 1 (d, e, f) com células positivas para perforina (setas) e células uNK do subtipo II em detalhe (f). Região 2 (g, h, i) com células com grânulos reativos ao anti-perforina (setas) e detalhe de células uNK do subtipo III Perforina⁺ (i). Região 3 (j, k, l) com células com grânulos reativos ao anti-perforina (setas) e detalhe de célula uNK do subtipo IV Perforina⁺ (l). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

5.6.2 Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo HL

Figura 18- Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HL



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HL no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para perforina (a-l). Região mesometrial mostrando células uNK Perforina⁺ (pontos castanhos) (a). Controle negativo para reação de imunocitoquímica para perforina (b e c). Região 1 (d, e, f) com células positivas para perforina (setas) que são semelhantes às uNKa em detalhe (e, f). Região 2 (g, h, i) com células reativas ao anti-perforina (setas) com muitos grânulos de aspecto vazio em detalhe (i). Região 3 (j, k, l) com células reativas ao anti-perforina (setas) semelhantes às uNKa e grânulos com interior perforina⁺ (l). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Nos sítios de implantação das fêmeas pertencentes ao grupo de dieta hiperlipídica, foram observadas muitas células reativas ao anticorpo anti-perforina em meio ao miométrio e endométrio da região mesometrial (**Figura 18a**). Nos cortes histológicos de sítios de implantação de animais HL onde foi omitido o anticorpo primário anti-perforina (controle negativo) não foi também observada nenhuma reação positiva (**figura 18b e 18c**).

Quando os cortes histológicos dos sítios de implantação foram observados em maiores aumentos em microscopia de luz, foi possível observar que na região 1 a reação para perforina era mais fraca (**Figura 18d**) que nos sítios de animais controle e os grânulos das células, que na sua maioria se assemelhavam às uNKa (**Figura 18e**), tinham aspecto de vazios, ou seja, com conteúdo total ou parcialmente negativo para o anti-Perforina (**Figura 18f**). Na região 2, foram também observadas células reativas para o anti-perforina (**Figura 18g**). Quando observadas em detalhe, a maioria dessas células era semelhante as uNKa (**Figura 18h**) e seus grânulos tinham delicado contorno reativo para o anti-perforina, porém com seu interior negativo para esse antiporpo o que lhes conferia o aspecto de vazio (**Figura 18i**). Resultado semelhante foi observado na região 3. Nessa região muito próxima do embrião, muitas células reativas para o anti-perforina forma observadas, no entanto, a reatividade dessas células parecia ser mais fraca (**Figura 18j**) que a observada nas regiões 1 e 2. A observação detalhada destas células revelou que estas eram semelhantes as uNKa (**Figura 18k**) e nelas também foram observados grânulos com conteúdo negativo para o anticorpo anti-perforina (**Figura 18l**).

5.6.3 Análise Imunocitoquímica para perforina grupo HC

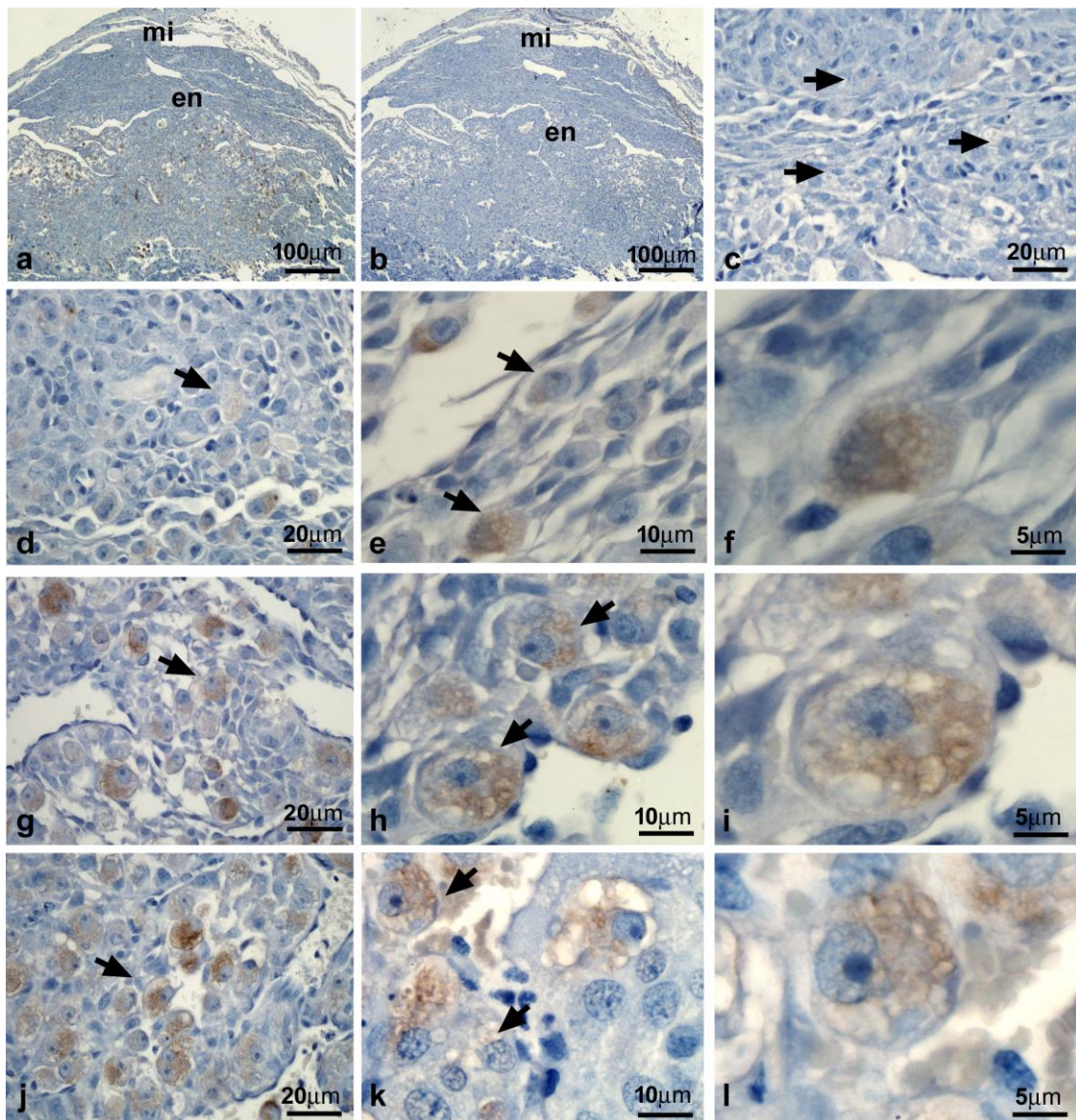
Os sítios de implantação das fêmeas do grupo HC foram os que apresentaram a reatividade mais fraca para o anticorpo anti-perforina, tanto na região de miométrio quanto no endométrio da região mesometrial (**Figura 19a**). Novamente não foi constada nenhuma reatividade nos sítios de implantação utilizados como controles negativos (**Figura 19b e 19c**).

A região 1, dos sítios de implantação destes animais continha muitas células não reativas e outras com fraca reatividade para o anti-perforina (**Figura 19d**). Quando observadas em aumentos maiores em microscopia de luz, as uNK fracamente reativas para o anti-perforina (**Figura 19e**) tinham seus grânulos com aspecto de vazios (**Figura 19f**), o que as deixava semelhantes as uNKa DBA.

Na região 2 a maioria das células reativas para o anti-perforina pareciam maiores que aquelas observadas na região 1 mas também reagiam fracamente para esse anticorpo (**Figura 18g**) e tinham aspecto de células uNKa (**Figura 19h**) com grânulos que embora aparentassem tamanho maior, possuíam conteúdo Perforina- (**Figura 19i**).

As células reativas para o anti-perforina da região 3 eram semelhantes em tamanho e reatividade àquelas encontradas na região 2 (**Figura 19j**), ou seja, eram fracamente reativas ao anti-perforina (**Figura 19k**), tinham aspecto de uNKa e o conteúdo translucido de seus grânulos conferiam-lhes o aspecto de vazios (**Figura 19l**).

Figura 19- Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HC



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HC no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para perforina (a-l). Região mesometrial mostrando células uNK fracamente reativas para perforina (pontos castanhos) (a). Controle negativo para reação de imunocitoquímica para perforina (b e c). Região 1 (d, e, f) com células fracamentereativas para perforina (setas) que são semelhantes às uNKa em detalhe (e, f). Região 2 (g, h, i) com células reativas ao anti-perforina (setas) com muitos grânulos de aspecto vazio em detalhe (i). Região 3 (j, k, l) com células reativas ao anti-perforina (setas) semelhantes às uNKa e grânulos perforina (l). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

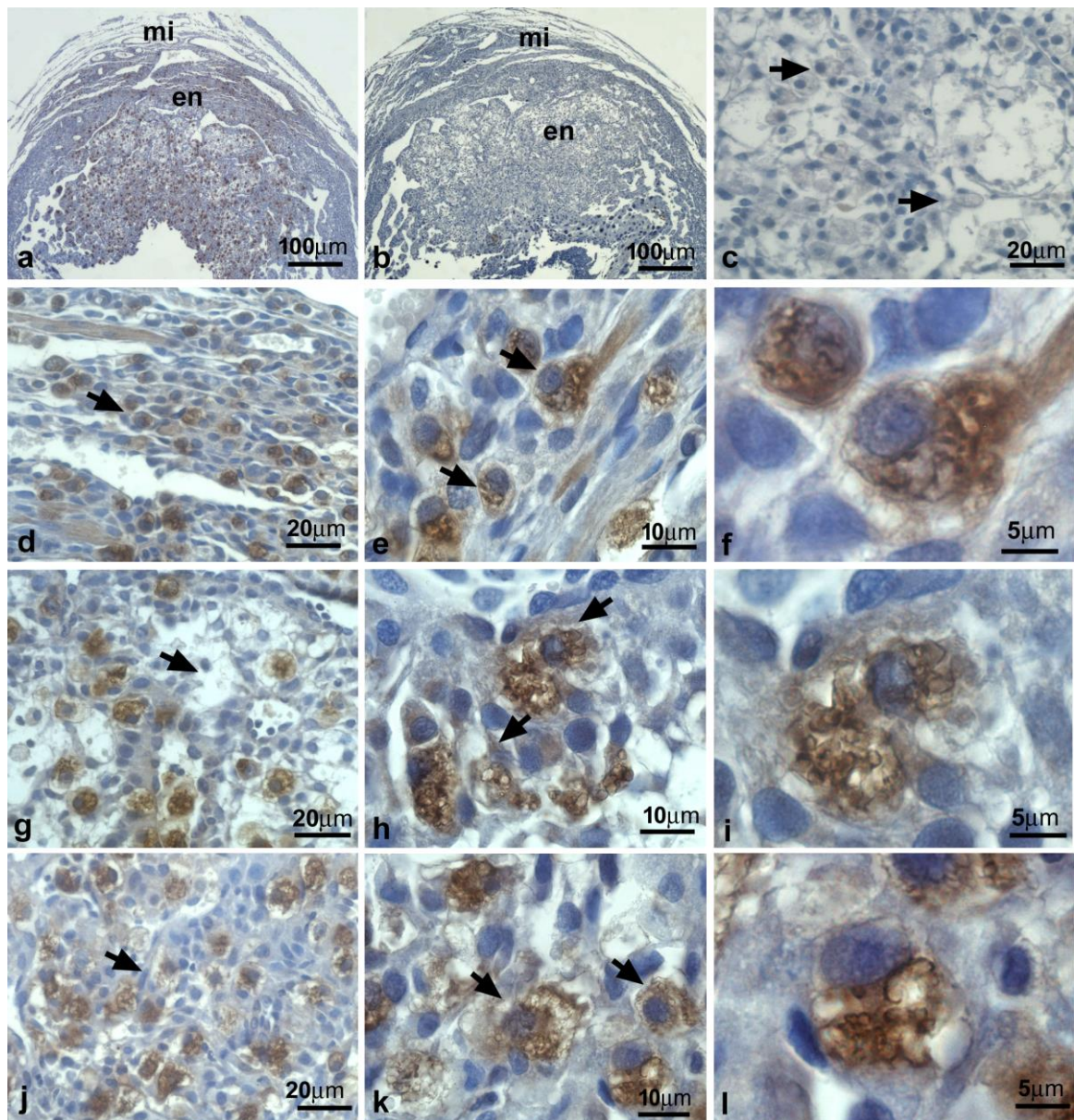
5.6.4 Análise Imunocitoquímica para perforina no grupo HP

Nos sítios de implantação embrionária de animais submetidos a dieta rica em proteína foram observadas células fortemente reativas ao anticorpo anti-perforina e semelhantes as uNK em meio ao miométrio e endométrio da região mesometrial (**Figura 20a**). Todos os cortes histológicos utilizados como controle negativo não exibiam reatividade (**Figuras 20b e 20c**).

Na região 1 dos sítios do grupo HP, diferente do observado na mesma região de animais controle, foram observadas células com padrão variável de reatividade para o anti-perforina (**Figura 20d**). Muitas células desses animais possuíam grânulos de tamanhos variados (**Figura 20e**), sendo que muitas vezes os menores apresentavam aspecto de cheios, enquanto os maiores estavam aparentemente vazios, ou seja, negativos para perforina em seus interiores, as quais, na sua maioria se assemelhavam as uNK do subtipo IV (**Figuras 20f**).

A região 2 dos sítios das fêmeas do grupo HP também apresentou grande quantidade de células uNK positivas para perforina (**Figura 20g**). No entanto, as células observadas nesta região também apresentaram reatividade para o anti-perforina distinta daquela observada nos camundongos controle, nesta mesma região (**Figura 20h**), sendo que esses grânulos pareciam menores e muitos deles, apesar de pequenos, tinham seu interior menos reativo para o anti-perforina, mas com contorno perforina⁺ (**Figura 20i**), semelhante às uNKa DBA⁺ observadas nestes animais.

Figura 20- Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo HP



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HP no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para perforina (a-l). Região mesometrial mostrando células uNK reativas para perforina (pontos castanhos) (a). Controle negativo para reação de imunocitoquímica para perforina (b e c). Região 1 (d, e, f) com células reativas para perforina (setas) com grânulos reativos e não reativos para perforina (e, f). Região 2 (g, h, i) com células reativas ao anti-perforina (setas) com muitos grânulos com interior negativo para o anti-peforina (i). Região 3 (j, k, l) com células reativas ao anti-perforina (setas) semelhantes às uNKa com grânulos com interior perforina (l). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Na região 3, foram observadas muitas células reativas para o anti-perforina com grânulos de tamanhos e reatividade para esse anticorpo variáveis, semelhante às uNKa DBA⁺ encontradas nessa região desse grupo (**Figura 20J**), ou seja, alguns de seus grânulos eram pequenos e perforina⁺, enquanto outros eram grandes e tinha conteúdo perforina⁻ e contorno positivo, o que conferia aos últimos o aspecto de estarem vazios (**Figuras 20k e 20l**).

5.6.5 Análise Imunocitoquímica para perforina grupo RA

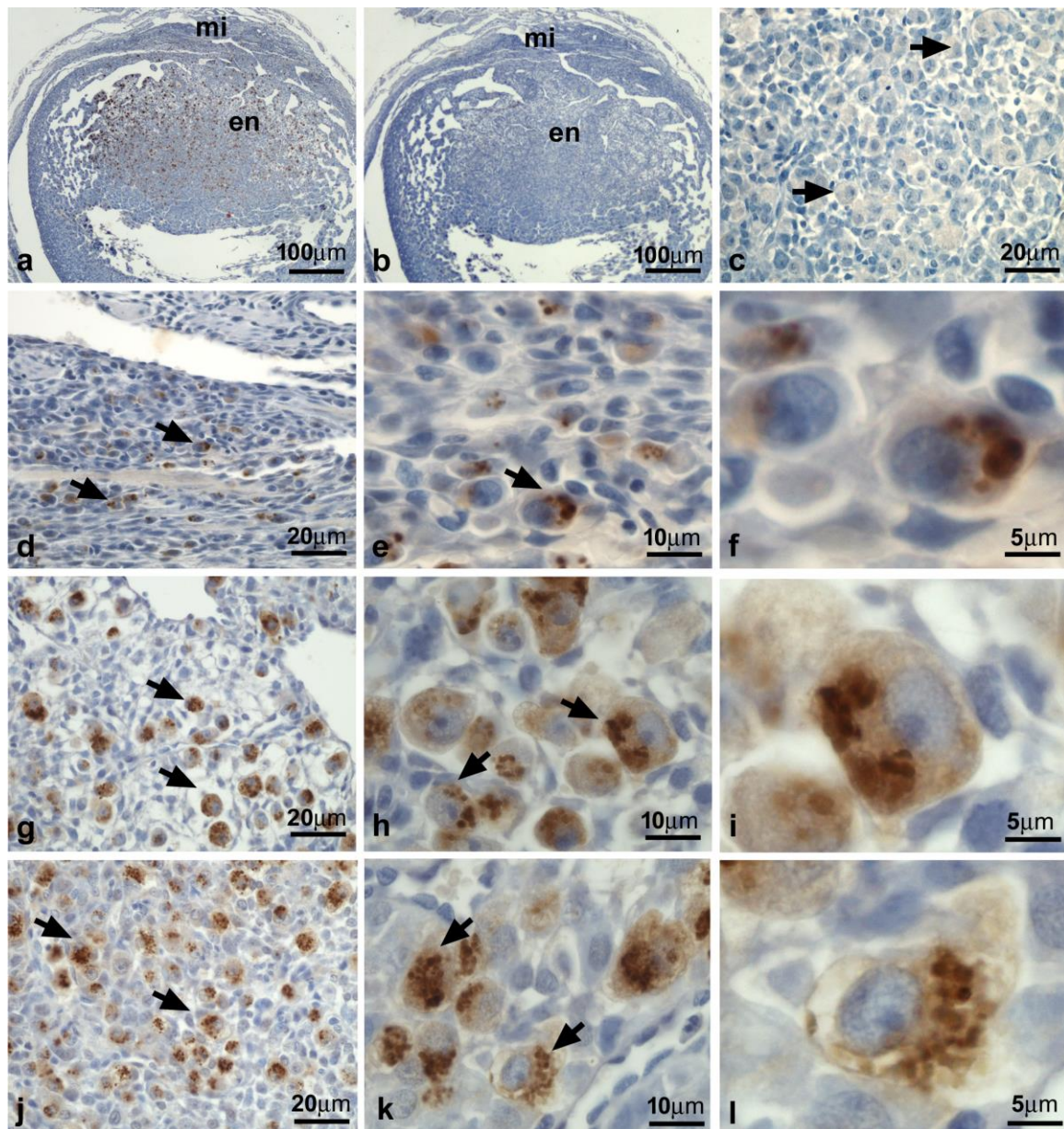
Nos sítios de implantação das fêmeas RA submetidos à imunocitoquímica para perforina foi possível observar muitas células perforina⁺ no miométrio e endométrio da região mesometrial (**Figura 21a**), de maneira muito semelhante ao observado no grupo RC. Todas os cortes de sítios de implantações de HP utilizados como controle negativos não apresentaram nenhuma reatividade (**Figura 21b e 21c**).

As células reativas para o anti-perforina presentes no miométrio (Região 1) pareciam pequenas (**Figura 21d**) e a maioria era semelhante às células uNK DBA⁺ do subtipo II (**Figuras 21e**). A maioria dessas células exibia poucos grânulos, os quais reagiam fortemente com o anticorpo anti-perforina o que lhes conferia o aspecto de estarem cheios (**Figuras 21f**).

O estudo da região 2 mostrou que está apresentava grande quantidade células uNK positivas para perforina (**Figura 21g**), as quais, assim como na região anterior, apresentavam grânulos citoplasmáticos fortemente reativos ao anti-perforina e, ou seja, com aspecto de cheios além de se assemelharem ao subtipo II ou III de células uNK DBA⁺ (**Figuras 21h e 21i**).

Na região 3 foi evidenciado grande quantidade células com grânulos que apresentaram forte reatividade para o anti-perforina (**Figura 21j**), ou seja, encontravam-se cheios desta enzima à exemplo do observado nos animais controle. A maioria dessas células desta região apresentavam aspectos morfológicos condizentes àqueles apresentados pelas células uNK DBA⁺ do subtipo III (**Figuras 21k e 21l**).

Figura 21- Fotomicrografia de imunocitoquímica do grupo RA



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos RA no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para perforina (a-l). Região mesometrial mostrando células uNK Perforina⁺ (pontos castanhos) (a). Controle negativo para reação de imunocitoquímica para perforina (b e c). Região 1 (d, e, f) com células positivas para perforina (setas) e células uNK do subtipo II em detalhe (f). Região 2 (g, h, i) com células com grânulos reativos ao anti-perforina (setas) e detalhe de células uNK do subtipo III Perforina⁺ (i). Região 3 (j, k, l) com células com grânulos reativos ao anti-perforina (setas) e detalhe de célula uNK do subtipo IV Perforina⁺ (l). DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

5.6.6 Imunofluorescência para Caspase 3-clivada

5.6.6.1 Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo RC

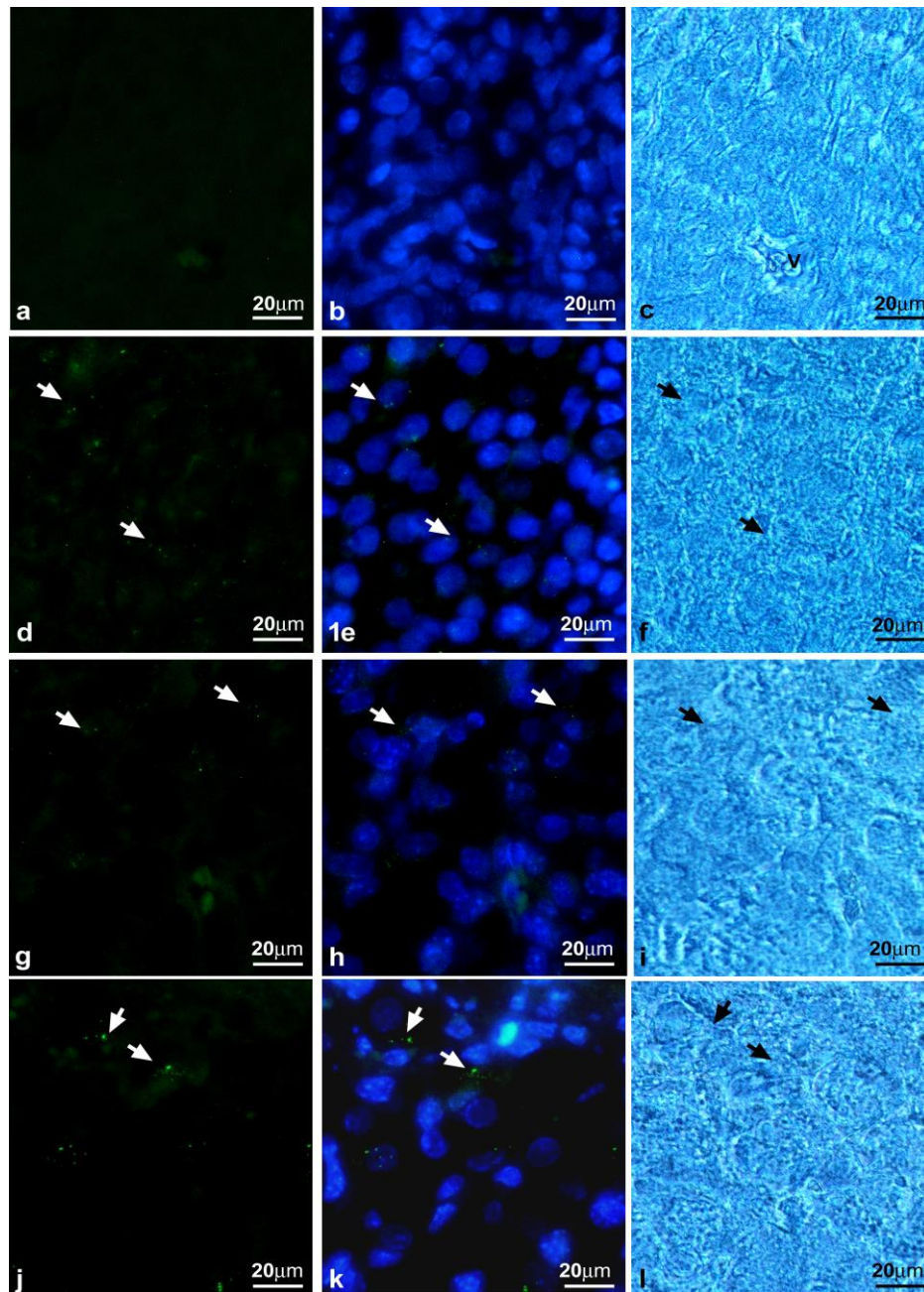
Nos cortes histológicos dos sítios de implantação do grupo RC nos quais foi omitida a incubação com anti-corpo anti-caspase 3 clivada (anti-Casp3) não foi observado, como esperado, qualquer indício de reatividade (**Figura 22a, 22b e 22c**).

Na região 1, dos sítio de implantação de fêmeas RC submetidos ao anti-Casp3 foi possível observar poucas células com a forma ativa (clivada) da caspase 3 (**Figura 21d**). Quando presente, a reatividade foi observada no citoplasma e/ou muito próxima ao núcleo (**Figura 22e e 22f**).

A região 2, assim como R1, apresentou escassas células reativas ao anti-Casp3 (**Figura 22g**). A marcação positiva era presente no citoplasma (**Figuras 22h e 22i**).

Na região 3, assim como nas regiões anteriores, poucas células reagiram com o anti-Casp3 (**Figura 22j**). Nestas células a marcação estava presente ao redor e/ou muito próxima ao núcleo (**Figura 22k e 22l**).

Figura 22- Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo RC



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos RC no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para Casp-3 (a-l). Controle negativo da reação (a, b e c). Região 1 (d, e, f) mostrando poucas células reativas para o anti-caspase (setas) (d, e) e as mesmas células sob contraste de fase (f). Região 2 (g, h, i) mostrando células caspase⁺ (setas) (g, h) e as mesmas células sob contraste de fase (i). Região 3 (j, k, l) mostrando células caspase⁺ (setas) (j, k) e as mesmas células em contraste de fase (l). Vaso sanguíneo (v). Anti-casp3-clivada/FITC (a, d, g, j). Anti-casp3-clivada/FITC e DAP (b, e, h, k). Contraste de fase diferencial (DIC). (c, f, i, l).

Fonte: do autor.

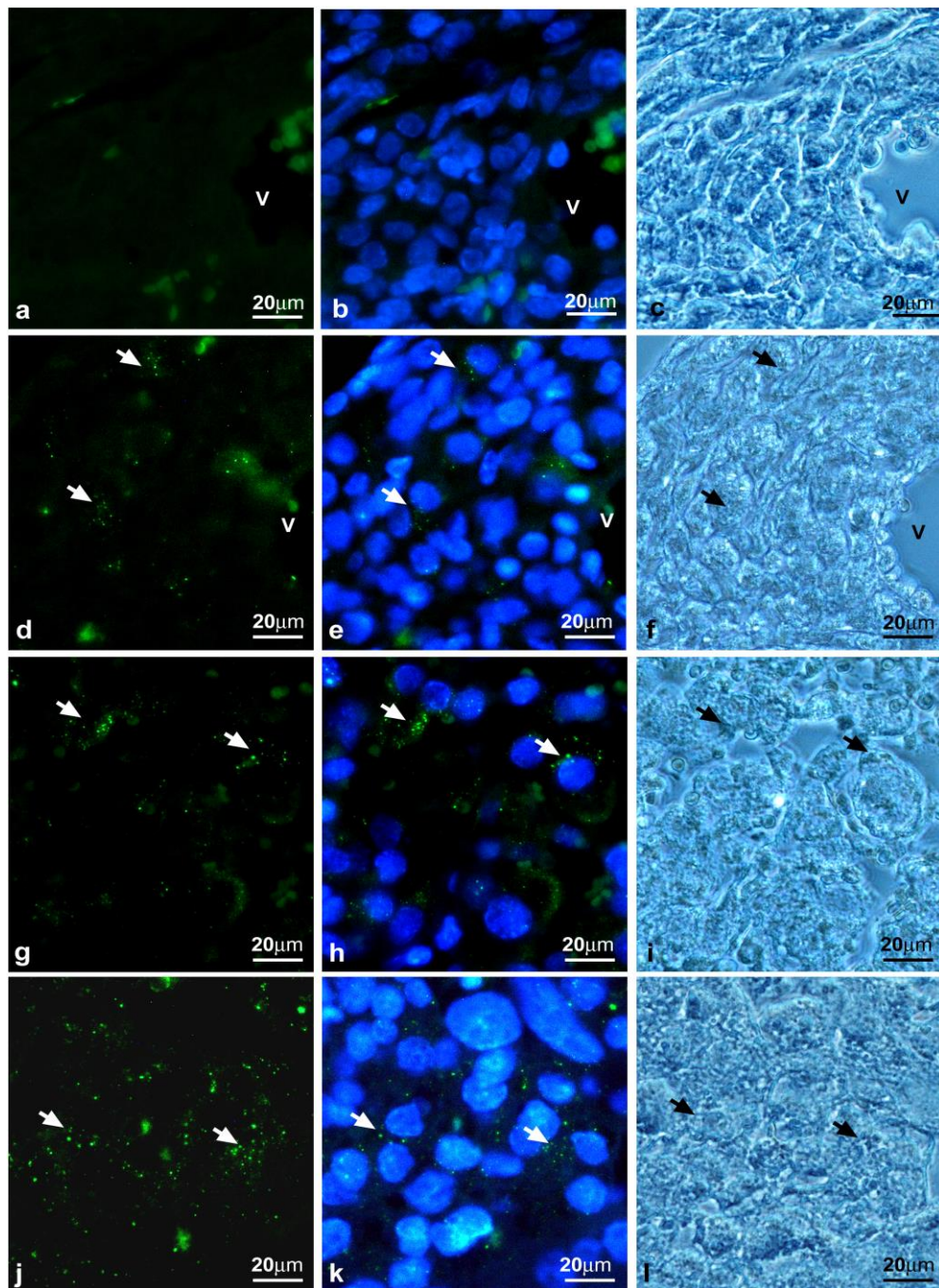
5.6.6.2 Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo HL

Como era esperado, o controle negativo da reação para Casp3 nos sítio de implantação de fêmeas HL não apresentou reatividade, a não ser aquela caracterizada como auto-fluorescência de eritrócitos (**Figura 23a, 23b e 23c**).

Na região 1 (**Figura 23d, 23e e 23f**) e região 2 (**Figura 23g, 23h e 23i**) dos sítios de implantação desses animais, foram observadas mais células reativas para o anti-Casp3 em relação às mesmas regiões do grupo RC. A reação positiva, tanto na R1 (**Figura 23e e 23f**), quanto na R2 (**Figura 23h e 23i**) se deu no citoplasma, a semelhança do observado no grupo controle.

Na região três as células com os citoplasmas reativos para anti-Casp3 (**Figura 23j, 23K e 23l**) pareciam mais abundantes que nas outras regiões dos animais HL e quando comparadas aos animais RC.

Figura 23- Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo HL



Nota: Controle negativo da reação (a, b e c). Região 1 (d, e, f) mostrando células reativas para o anti- Casp-3 (setas) (d, e) e as mesmas células sob contraste de fase (f). Região 2 (g, h, i) mostrando células Casp-3⁺ (setas) (g, h) e as mesmas células sob contraste de fase (i). Região 3 (j, k, l) mostrando muitas células Casp-3⁺ (setas) (j, k) e as mesmas células em contraste de fase (l). Vaso sanguíneo (v). Anti-casp3-clivada/FITC (a, d, g, j). Anti-casp3-clivada/FITC e DAP (b, e, h, k). Contraste de fase diferencial (DIC) (c, f, i, l).

Fonte: do autor.

5.6.6.3 Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo HC

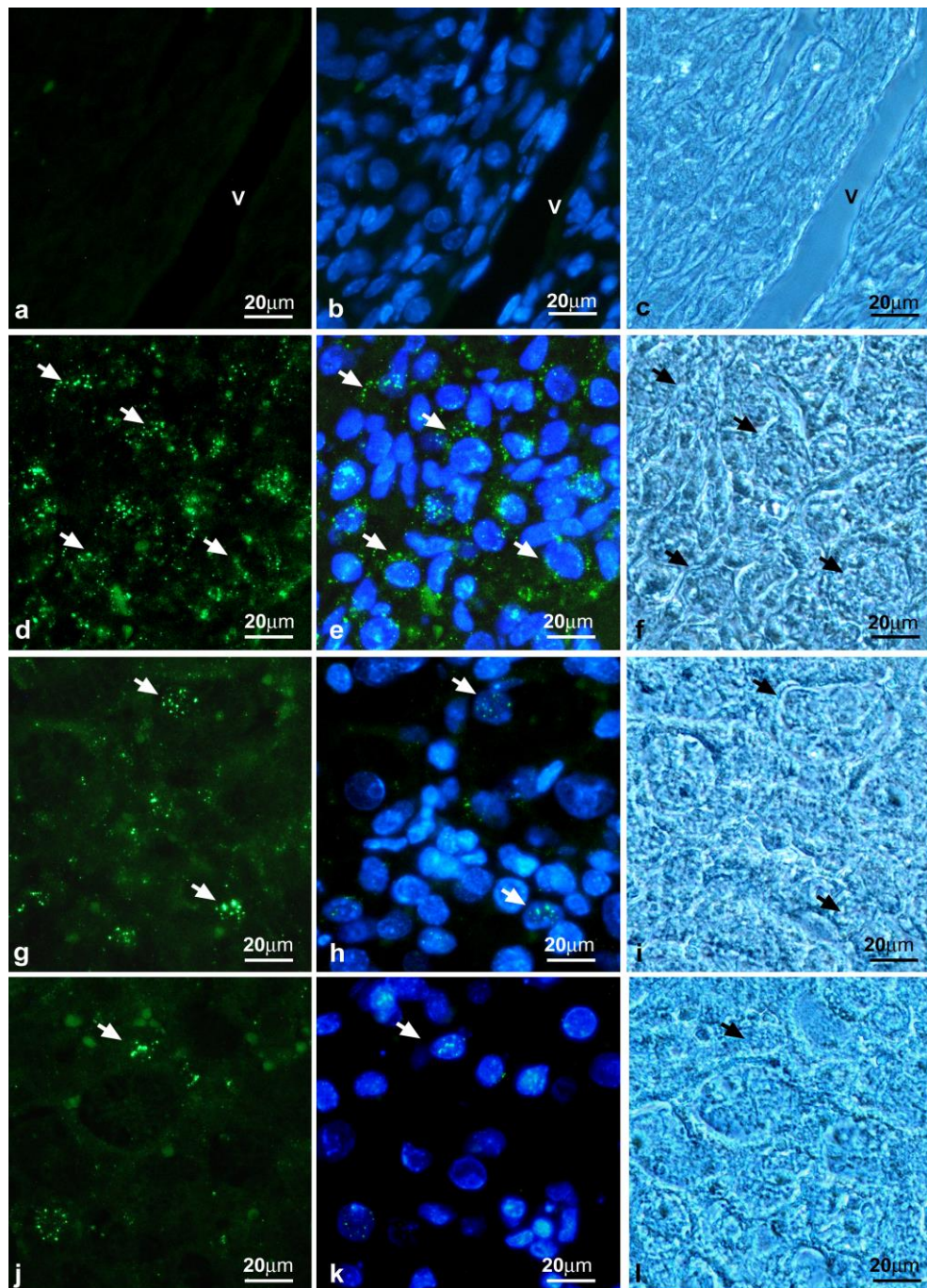
Nos cortes histológicos dos sítios de implantação de animais HC utilizados como controles negativos da reação com anti-Casp3, não foram observadas reações positivas como esperado (**figura 24a, 24b e 24c**).

Os animais do grupo HC tinham sítios de implantação com muitas células reativas para o anti-Casp3 na região 1 (**Figuras 24d, 24e e 24f**).

Na região 2 dos sítios de implantação de HC as células anti-Casp3⁺ continuaram a ser observadas (**figura 24g, 24h e 24i**), no entanto essa pareciam ocorrer em menor número que na região 1.

Na região 3, as células anti-Casp3⁺ também não eram tão abundantes quanto o observado na região 1 (**Figura 24j, 24k e 24l**).

Figura 24- Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo HC



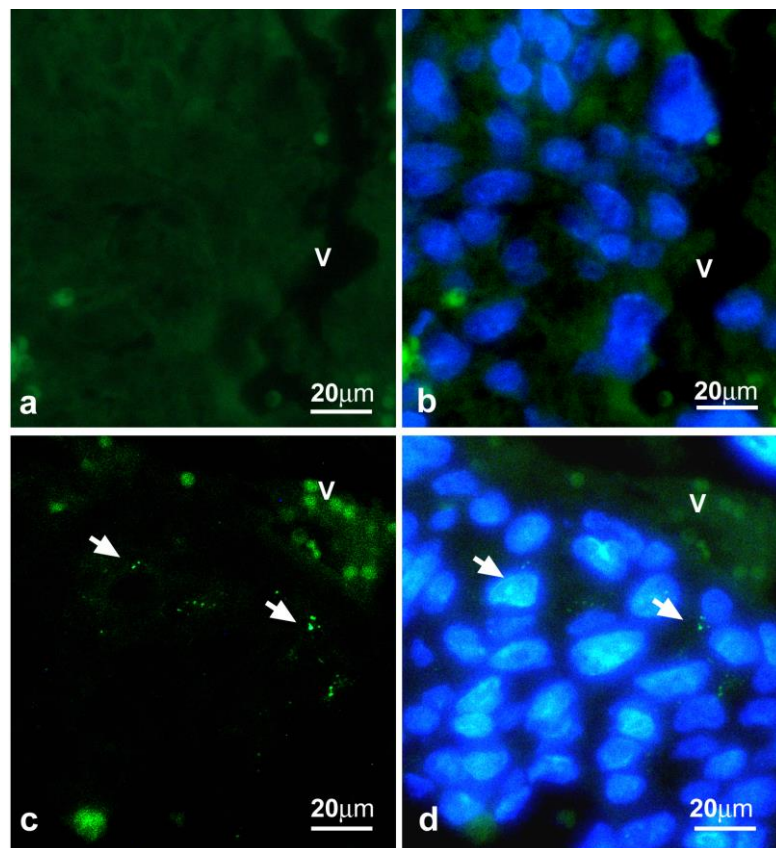
Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HC no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para Casp-3 (a-l). Controle negativo da reação (a, b e c). Região 1 (d, e, f) mostrando muitas células reativas para o anti-Casp-3 (setas) (d, e) e as mesmas células sob contraste de fase (f). Região 2 (g, h, i) mostrando células Casp-3⁺ (setas) (g, h) e as mesmas células sob contraste de fase (i). Região 3 (j, k, l) mostrando células Casp-3⁺ (setas) (J, k) e as mesmas células em contraste de fase (l). Vaso sanguíneo (v). Anti-casp3-clivada/FITC (a, d, g, j). Anti-casp3-clivada/FITC e DAP (b, e, h, k). Contraste de fase diferencial (DIC) (c, f, i, l).

Fonte: do autor.

5.6.6.4 Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo HP

Como nas reações controle citadas anteriormente, os cortes histológicos provenientes de HP, utilizados como controles negativos da reação imunocitoquímica para Casp3, não exibiam reação positiva, a não ser aquela proveniente da autofluorescência dos eritrócitos (**Figura 25a e 25b**). Nos sítios de implantação de animais que receberam ração rica em proteína, as células reativas para o anti-Casp3 eram raras e foram observadas restritas à região 3 (**Figuras 25c e 25d**).

Figura 25- Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo HP



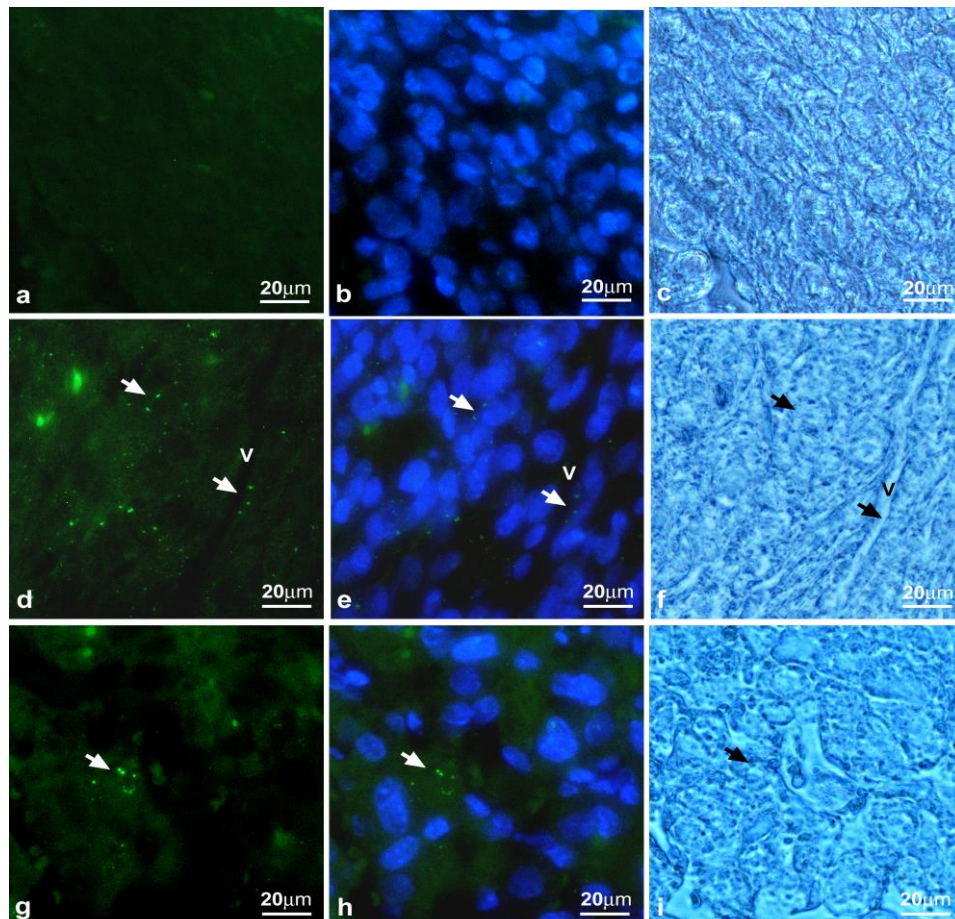
Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HP no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para Casp-3 (a-d). Controle negativo da reação (a e b). Região 3 (c e d) mostrando células Casp-3⁺ (setas). Vaso sanguíneo (v). Anti-casp3-clivada/FITC (a e c). Anti-casp3-clivada/FITC e DAP (b e d).

Fonte: do autor.

5.6.2.5 Imunocitoquímica para Caspase 3-clivada no grupo RA

No grupo submetido à restrição alimentar, os sítios de implantação utilizados para o controle negativo não foram reativos (**Figura 26a, 26b e 26c**). No grupo RA foram observadas poucas células reativas ao anti-Casp3 nas regiões 2 (**Figuras 26d, 26e e 26f**) e 3 (**Figuras 26g, 26h e 26i**), enquanto na região 1 não foram observadas células reativas para esse anticorpo (dados não mostrados).

Figura 26- Imunofluorescência para Caspase 3-clivada no grupo RA



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos HC no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para Casp-3 (a-i). Controle negativo da reação (a, b e c). Região 2 (d, e, f) mostrando células reativas para o anti- Casp-3 (setas) (d, e) e as mesmas células sob contraste de fase (f). Região 3 (g, h, i) mostrando células Casp-3⁺ (setas) (g, h) e as mesmas células sob contraste de fase (i). Vaso sanguíneo (v). Anti-casp3-clivada/FITC (a, d, g). Anti-casp3-clivada/FITC e DAP (b, e, h). Contraste de fase diferencial (DIC) (c, f, i).

Fonte: do autor.

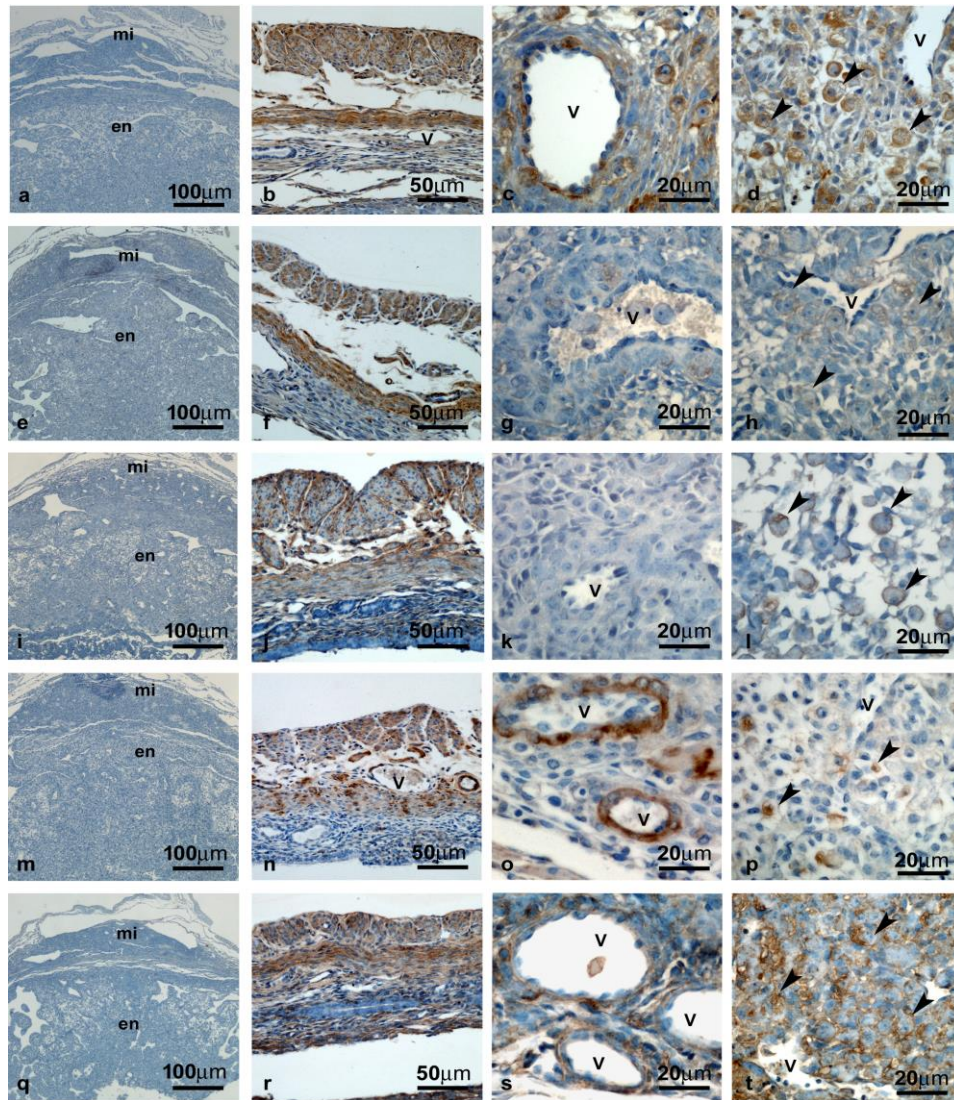
5.6.3 Imunocitoquímica para α -actina

Os cortes histológicos dos sítios de implantação de animais do grupo RC, nos quais foi omitida a incubação com o anticorpo anti- α -actina, foram totalmente não reativos como esperado (**Figura 27a**). No entanto, o miométrio dos cortes histológicos desses sítios de implantação foi fortemente reativo para o anti- α -actina (**Figura 27b**). Adicionalmente, no endométrio dos cortes de HC, foram observados vasos sanguíneos com suas células musculares lisas reativas para o anti- α -actina (**Figura 27c**), bem como, células semelhantes às uNK positivas para esse anticorpo (**Figura 27d**). A reatividade para o anti- α -actina, frequentemente foi observada em uma região polarizada do citoplasma dessas células semelhantes às uNKs.

Nos controles negativos da reação para α -actina do grupo HL também não foi observada nenhuma reatividade (**Figura 27e**) e o miométrio desses animais foi fortemente reativo para o anticorpo anti- α -actina (**Figura 27f**), com intensidade semelhante ao do grupo RC. Mesmo tendo o miométrio fortemente reativo para esse anticorpo, nos sítios de implantação de animais HL os vasos sanguíneos eram totalmente negativos para anti- α -actina (**Figura 27g**) e células semelhantes às uNK exibiam fraca reatividade para anti- α -actina (**Figura 27h**) quando comparadas ao RC.

Nos cortes histológicos de sítio de implantação do grupo de fêmeas que consumiram dieta rica em carboidrato, o controle negativo não apresentou qualquer reação positiva (**Figura 27i**). No entanto, o miométrio destes animais era também fortemente reativo para esse anticorpo (**Figura 27j**) como o observado no grupo RC. Os vasos sanguíneos dos sítios de implantação desses animais eram negativos para o anti- α -actina (**Figuras 27k**) e células semelhantes às uNK exibiam fraca reatividade para esse anticorpo (**Figura 27l**), semelhante ao encontrado no grupo HL e diferente de células equivalente observadas no grupo RC.

Figura 27- Fotomicrografias de imunocitoquímica para α -actina



Nota: Fotomicrografias de sítio de implantação de camundongos no 10^o ddg submetido à imunocitoquímica para α -actina (a-t). Grupo RC (a-d) onde pode ser observado o controle negativo da reação (a), o miométrio fortemente reativo para o anti- α -actina (b), bem como a reatividade nos vasos (c) e em células semelhantes às uNK (d). Grupo HL (e-h) onde pode ser observado o controle negativo da reação (e), o miométrio fortemente reativo para o anti- α -actina (f), bem como os vasos α -actina⁺ (g) e a fraca reação para α -actina em células semelhantes às uNK (h). Grupo HC (i-l) onde pode ser observado o controle negativo da reação (i), o miométrio fortemente reativo para o anti- α -actina (j), bem como os vasos α -actina⁺ (k) e a fraca reação para α -actina em células semelhantes às uNK (l). Grupo HP (m-p) onde pode ser observado o controle negativo da reação (m), o miométrio fortemente reativo para o anti- α -actina (n), bem como, os vasos fortemente reativos para o anti- α -actina (o) e as células semelhantes às uNK α -actina⁺ (l). Grupo RA (q-t) onde pode ser observado o controle negativo da reação (q), o miométrio fortemente reativo para o anti- α -actina (r), bem como, os vasos reativos para o anti- α -actina (s) e as células semelhantes às uNK positivas para esse anticorpo (t). Células semelhantes às uNK (cabecinhas de setas). mi- miométrio; en- endométrio; v- vaso sanguíneo. DAB-Peroxidase e Hematoxilina.

No grupo HP, assim como esperado, nos cortes utilizados como controles negativos, não foi observada nenhuma reação positiva (**Figura 27m**) e as células musculares lisas do miométrio continuaram a ser observadas fortemente positivas para o anti- α -actina (**Figura 27n**). Nos sítios de implantação de HP, no entanto, foram observados vasos fortemente reativos para o anti- α -actina (**Figura 27o**), sendo essa reatividade claramente maior que aquela observada em vasos de animais controle. Poucas células semelhantes às uNK exibiam forte reatividade para o anti- α -actina nos sítios de implantação de HC (**Figura 27p**).

O padrão de reação para o anticorpo anti- α -actina nos sítios de implantação de fêmeas RA apresentou-se muito semelhante aquele observado no grupo RC. No controle negativo não foi observada reação positiva (**Figura 27q**), o miométrio foi fortemente reativo (**Figura 27r**), os vasos sanguíneos (**Figura 27s**) e as células semelhantes às uNK (**Figura 27t**) exibiam reatividades semelhantes às mesmas células encontradas em RC.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a análise do consumo diário de ração entre os grupos HL, HC e HP em relação ao grupo RC. Os resultados mostram não ter ocorrido diferença significativa entre os grupos de dieta alterada e o grupo controle. De acordo com Chorilli, Michelin e Salgado (2007), um camundongo normal adulto pode consumir em média 5g de ração/dia, corroborando com os dados apresentados no gráfico da figura 3, onde pode-se observar que as fêmeas prenhes de todos os grupos consumiram no mínimo 5g de ração/dia.

A análise do ganho de peso dos animais prenhes submetidos às diferentes dietas revelou que os animais que consumiram as rações hiperproteica (HP) e hipercalórica (HC) tiveram o ganho de peso médio similar aos animais do grupo controle. Entretanto, nos animais tratados com a ração hiperlipídica (HL) foi observado um ganho de peso maior que aqueles tratados com ração controle. Townsend, Lorenzi e Widmaier relatam que o consumo de ração rica em gordura durante 3 semanas por fêmeas virgens já promoveria aumento de peso significativo. De fato, Moraes et al (2009) relataram que uma dieta rica em gordura é um dos principais fatores que levam ao ganho de peso e, conseqüentemente, à obesidade.

Como esperado, diferente dos demais grupos estudados, os animais do grupo submetido à restrição alimentar (RA) apresentaram redução no peso durante a gestação. Não existem relatos a respeito do peso de camundongos prenhes submetidos à restrição alimentar. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos encontrados em estudo durante a gestação de ratas submetidas à restrição de 50%, que descreveu a perda de peso destes animais (FERRARI; GABRIELLI; MELLO, 1992).

O estudo comportamental revelou que as fêmeas que consumiram ração hiperlipídica não apresentaram alterações nos parâmetros de ansiedade, depressão e retenção de memória. Contudo, nestes animais houve uma diminuição na taxa de exploração global dos objetos durante o teste de reconhecimento espontâneo de objetos. É possível que a dieta hiperlipídica possa ter originado um processo de inflamação sistêmica no organismo destes animais, o que promoveu a diminuição do comportamento exploratório. Neste sentido, diversos estudos apontam para a relação existente entre o consumo de dietas ricas em gordura com a expressão ou a

atividade de proteínas pertencentes à resposta inflamatória, tais como SOCS3, IKK, JNK e PTP1B (DE SOUZA et al, 2005; BENCE et al, 2006), os quais, por sua vez, prejudicam a sinalização de insulina e leptina no hipotálamo, interferindo nas rotas principais de saciedade e de deposição de gorduras que mantem uma massa corporal estável causando, portanto, obesidade. Outros autores afirmam que citocinas como TNF- α e IL-1 β são expressas em altas quantidades no hipotálamo de roedores alimentados com dieta rica em gordura, podendo induzir ainda, apoptose de diferentes tipos celulares (DE SOUZA et al, 2005; MUPPIDI; TSCHOPP; SIEGEL 2004; MORAES et al,2009). Além disso, citocinas como fator de necrose tumoral alfa e interleucina 1 β estão presentes na mediação de quadros fisiopatológicos como infecção e inflamação, levando a alterações no comportamento como diminuição do comportamento exploratório dentre outros sintomas (BLUTHÉ et al, 2000).

O grupo RA foi o único de todos os grupos analisados no qual foi observada alteração no comportamento semelhante à ansiedade. Nos animais deste grupo foi constatada maior exploração (maior tempo de permanência) dos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado em relação ao grupo controle. De acordo com Lister (1987), o aumento da atividade nos braços abertos indica redução da ansiedade.

Inoue et al (2004) mostraram que a restrição alimentar crônica produz efeito ansiolítico em ratos machos. Genn e colegas (2003) mostraram que ratos machos adultos e fêmeas adolescentes, submetidos à restrição alimentar, apresentaram maior exploração dos braços abertos revelando um provável efeito ansiolítico ou um reflexo de comportamento em busca de alimento, o qual talvez tivesse maior prioridade em relação à ansiedade gerada pelo aparato. Sendo assim, a restrição alimentar poderia alterar as prioridades comportamentais, aumentando a exploração e reduzindo a ansiedade (GENN et al, 2003). Estes resultados obtidos em ratos são semelhantes aos encontrados neste trabalho, embora não existam na literatura outros relatos do efeito ansiolítico da restrição alimentar em ratos ou camundongos durante a gestação.

Com relação aos demais grupos experimentais deste estudo (HL, HC e HP) não foram observadas alterações no comportamento no que diz respeito aos parâmetros ansiedade e depressão. Acredita-se que, durante a gestação e lactação, mulheres e fêmeas de roedores podem possuir uma resposta atenuada ao estresse resultando, possivelmente, na ausência de alteração comportamental (HILLERER et al, 2011). Isso ocorreria devido à modificação do eixo HPA (Hipotálamo- Pituitária-

Adrenal) (SLATTERY; NEUMANN, 2007; BRUNTON; RUSSELL; DOUGLAS, 2008), uma vez que no início da gestação os níveis de glicocorticoides são reduzidos significativamente e começam a subir novamente a partir do 10º ddg em camundongos (BARLOW; MORRISON; SULLIVAN, 1975), bem como, em ratos (ATKINSON; WADDELL, 1995). Neste trabalho a investigação se deu exatamente no 10º ddg, momento de início do reestabelecimento dos níveis de glicocorticoides descritos por esses autores. Neste sentido, é bastante plausível que a ausência de alterações nos parâmetros ansiedade e depressão, notada na maioria dos animais utilizados no presente estudos, esteja relacionada à modificação no eixo HPA causada pelos, ainda baixos, níveis de glicocorticoides neste período gestacional de camundongos.

A exemplo do que ocorreu nos estudos de depressão, durante o teste de reconhecimento espontâneo de objetos, também não foram observadas alterações significativas na memória dos animais submetidos aos diferentes tratamentos de nosso estudo.

Na análise uterina, após laparotomia, de todos os camundongos nos quais foram observadas rolhas vaginal pós-cópula, evidenciou-se que os animais dos grupos HP e HL foram diagnosticados como prenhes no 10º ddg e tiveram o número médio de sítios de implantação iguais ao controle. Já 4 animais do grupo HC e 11 animais do grupo RA não continham sítios de implantação, ou seja, não estavam prenhes e os úteros destes animais tinham aspecto de inchados e com pequenas divisões transversais, diferente de um útero virgem. Adicionalmente, quando os cortes histológicos dos sítios de implantação de todos os grupos foram analisados em microscopia de luz, após coloração de Hematoxilina e Eosina, foi possível diagnosticar nos animais submetidos à restrição alimentar indícios de morte celular em sítios de implantação onde era evidente a reabsorção embrionária.

Neste estudo não foi possível diagnosticar macroscopicamente e microscopicamente a morte embrionária em animais do grupo HC. No entanto, 4 dos animais deste grupo quando laparatomizados não continham sítios de implantação. Hodgson (2013) mostrou que camundongos machos que consomem um tipo de ração hipercalórica com altos índices de dextrose (amido) por 10 semanas desenvolveram hiperglicemia e resistência à insulina, desenvolvendo diabetes do tipo 2 e em mulheres, a diabetes durante a gestação é um importante fator de risco que pode promover a morte do feto (OHANA, et al, 2011). Apesar destas

observações, no presente estudo não foi notado aumento de glicose nas fêmeas do grupo HC em relação ao grupo RC, indicando que a perda gestacional evidenciada em 4 animais deste grupo pode não estar diretamente relacionada a alteração glicêmica *per si*.

Com relação à baixa viabilidade gestacional exibida no grupo RA, Ferrari, Gabrielli e Mello (1992) citaram que a restrição proteica em ratas adultas pode levar a redução de ninhadas, sendo observado aumento nas taxas de natimortos e de mortalidade perinatal. Ainda segundo estes autores, a restrição alimentar pode compor um quadro de estresse mais intenso que a restrição proteica. Neste sentido, é razoável supor que a restrição alimentar pode ter impedido a implantação ou provocado a morte embrionária, o que tornou inviável a gestação de cerca de 50% das fêmeas do grupo RA deste trabalho. Corroborando nossos resultados referentes às fêmeas do grupo RA, cuja gestação foi mantida até o 10º dia, os mesmos autores discorrem que tal evento pode ocorrer quando há aumento na eficiência alimentar das mães, não havendo, portanto, perda fetal significativa ou redução de ninhada.

Trabalho clássico, Berg (1965) obteve resultados semelhantes aos aqui apresentados para o grupo RA. Em seu trabalho, algumas ratas submetidas à restrição alimentar de 25%, 50% e 70%, tiveram uma gestação bem sucedida e com ninhadas de tamanho normal, enquanto outras não apresentavam sítios de implantação, ou seja, a gestação falhou completamente e isso ocorreu em todos os graus de restrição alimentar. Além disso, em seu estudo Pascalon e Bertrand (1987), os quais também realizaram restrição alimentar de 70%, 50% e 25%, mostraram haver um fenômeno de “tudo ou nada” com relação ao nascimento da prole e, quando havia morte embrionária precoce, esta ocorria em sua maioria antes do 10ºddg, corroborando os dados apresentados neste trabalho.

Como descrito anteriormente, os cortes histológicos dos sítios de implantação embrionária de camundongos no 10ºddg foram submetidos à citoquímica de lectina DBA para caracterização e quantificação dos diferentes subtipos de uNK DBA reativos amplamente citados na literatura (PAFFARO Jr et al, 2003; ZAVAN et al, 2010; HIYAMA et al, 2011; ZAVAN et al, 2012; LIMA et al, 2012; DEGAKI et al, 2012 e CHEN et al, 2012), ou seja, desde as formas menos diferenciadas (subtipo I e II) até as formas mais diferenciadas (subtipo III) e em provável senescência (Subtipo IV).

Neste trabalho foi possível também identificar um quinto subtipo de células uNK, as células Natural Killer alteradas (uNKa), descritas anteriormente apenas em estudos em camundongos prenhes onde foi realizado o protocolo invasivo da eutanásia cirúrgica intrauterina do embrião (ROMAN, 2001; COPI, 2006; LIMA et al, 2012) ou protocolo que mimetize a infecção por meio da injeção intraperitoneal de LPS (LIPPE, 2007; ZAVAN, 2011). Nas uNKa deste estudo, a exemplo do que estes autores relataram, foi observada uma descontinuidade ou ausência de reatividade para lectina DBA na superfície celular, bem como, grânulos de aspecto vazio ou totalmente não reativos para esta lectina.

As células uNKa foram descritas primeiramente por Roman (2001) em estudos do útero prenhe de camundongos após eutanásia embrionária provocada cirurgicamente. Mais tarde, Lippe (2007) e Zavan (2011), descreveram células com padrão de reatividade para lectina DBA idênticas a estas uNKa em camundongos tratados intraperitonealmente com LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*).

Quanto à análise estereológica dos subtipos de uNK, observou-se que o consumo das dietas hiperlipídica, hipercalórica, hiperproteica, bem como a restrição alimentar, não foram capazes de causar mudanças estatisticamente significativas na distribuição e incidência da forma menos diferenciada (subtipo I) de células uNK DBA reativas. Paffaro Jr, et al (2003) descrevem as células uNK do subtipo I como células imaturas morfologicamente. O subtipo I seria a forma precursora de células uNK, muito parecida com um linfócito da corrente sanguínea. Sendo assim, as uNK DBA⁺ chegariam ao útero prenhe na forma de subtipo I e, dentro deste microambiente e por meio de fatores ainda não conhecidos, passariam a expressar a N-acetil-D-galactosamina em suas membranas que pode ser identificada pela lectina DBA. O subtipo I, que realizaria diapedese em uma região distante do embrião (região 1) se diferenciaria em subtipo II, uma forma ainda pequena de células uNK, onde podem ser observados ainda poucos grânulos citoplasmáticos DBA reativos. Neste sentido, o fato do subtipo I de uNK de camundongos prenhes não sofrer alteração quanto a incidência e localização neste trabalho pode ser explicado pelo fato desta forma ser a forma precursora, ainda imatura de célula uNK e distante do embrião implantado.

Com relação ao subtipo II (em diferenciação) e III (forma mais diferenciada) de células uNK DBA⁺, estes foram observados em menor número em animais do grupo HL do que em animais do grupo controle na região 1. Além da diminuição do

subtipo III de uNK na região 1, estas células foram também encontradas em pequeno número nas regiões 2 e 3. Interessantemente a diminuição em número destas formas, subtipo II e III de células uNK, ocorreu concomitante ao aumento de células uNKa nos animais do grupo HL nas 3 regiões do SI.

A obesidade pode ser considerada uma doença inflamatória (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993), podendo levar ao aumento de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea (RAMOS et al, 2003) e expressão de genes mediadores de inflamação nos ovários e no tecido adiposo que os envolvem afetando negativamente as funções ovarianas (NTEEBBA et al, 2013).

Quadros que mimetizem a inflamação podem ser obtidos por meio de protocolos experimentais que utilizam a administração de LPS, o qual, por sua vez, também é capaz de provocar uma resposta inflamatória mesmo durante a gestação, causando hiperemia nos sítios de implantação (LIPPE, 2007) e presença de infiltrado de leucócitos, incluindo granulócitos (OGANDO et al, 2003). Condição semelhante a esta poderia ser imposta pela eutanásia embrionária durante a gestação realizada por Roman (2001), Copi (2006) e Lima (2012), gerando também quadros semelhantes à inflamação. Ambos os insultos (LPS ou morte embrionária cirúrgica) podem, portanto, alterar a homeostase uterina, a ponto de alterar a expressão de N-acetil-D-galactosamina nos grânulos e membrana das uNK. (ROMAN, 2001; COPI, 2006; LIMA et al., 2012; LIPPE, 2007; ZAVAN, 2011), dando origem ao subtipo alterado de células natural killer uterinas.

Neste estudo verifica-se que o consumo de dieta rica em lipídios, portanto, pode interferir na biologia das células uNK DBA⁺. Parker e colaboradores (2014) afirmaram que a obesidade pode promover aumento na síntese de progesterona e alterar o número de células Natural Killer uterinas, inclusive reduzir a expressão de Interferon- γ pelas células NK no 7,5 ddg. Entretanto, no estudo de Parker et al. (2014) as fêmeas consumiram dieta rica em gordura e açúcar por 12 semanas antes da prenhez. O presente trabalho demonstrou que apenas 10 dias de consumo de ração hiperlipídica já foi suficiente para promover alterações na biologia das células uNK.

Semelhante ao grupo HL, o grupo HC apresentou diminuição dos subtipos II e III na região 1 dos sítios de implantação, além disso, foi observado diminuição do subtipo III de uNK nas regiões 2 e 3. Como ocorrido nos SI de fêmeas hiperlipídicas, a diminuição em número destas formas II e III de células uNK, ocorreu de maneira

simultânea ao aumento de células uNKa nas 3 regiões dos sítios de desenvolvimento embrionário.

Dados da literatura mostram que uma dieta hiperglicídica pode levar a neolipogênese, processo pelo qual carbonos provenientes de carboidratos são transformados em lipídios (ácidos graxos) e que este processo é altamente ativo em roedores (PARKS, 2002). Sabe-se muito pouco sobre a estimulação da neolipogênese em humanos, mas presume-se que quanto mais alta a glicemia pós-prandial, maiores são as chances de ocorrer aumento na síntese de ácidos graxos a partir da glicose, devido ao fornecimento excessivo de átomos de carbono (PARKS, 2001). Nesse sentido, é viável a hipótese de que a dieta ingerida pelas fêmeas do grupo HC possa ter causado a neolipogênese com consequente aumento de ácidos graxos no organismo das fêmeas prenhes, desencadeando respostas similares às que provavelmente ocorreram no grupo HL e que levaram ao aparecimento de células uNKa com a mesma incidência nos dois grupos (HL e HC).

Corroborando a hipótese, de que a ração hipercalórica teria desencadeado processo inflamatório em nossas análises, um estudo realizado com mulheres, as quais já haviam passado pelo período de menopausa, mostrou que o consumo de uma dieta com baixas quantidades de gordura, porém, rica em carboidrato, promoveu queda no peso e aumento de marcadores inflamatórios nessas mulheres (KARAKAS et al, 2006). Além disso, McFarlin, Flynn e Hampton (2007) demonstraram que o consumo de carboidrato aumenta, *in vitro*, a resposta de células NK a citocinas pró-inflamatórias Th1(IL-2 e IFN- γ).

Como demonstrado pelos resultados obtidos na análise estereológica, nos grupos HL e HC não ocorreu alteração do subtipo IV em nenhuma das 3 regiões dos sítios de implantação das fêmeas destes grupos. Como descrito por Paffaro et al. (2003) o subtipo IV de células uNK DBA reativas, localiza-se, em sua maioria, na região 3 dos sítios de implantação, mais próxima ao embrião, e é considerado o subtipo morfológicamente senescente de células uNK DBA⁺. Os dados apresentados neste trabalho quanto a incidência e localização do subtipo I e IV de uNK DBA⁺ em conjunto com a diminuição em número dos subtipos II e III destas células e ocorrência de células uNKa nos animais HL e HC, indicam que as alterações causadas por essas duas dietas acontecem nos subtipos mais diferenciados e plenamente ativos das uNK, ou seja, subtipos II e III.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que nos sítios de implantação de fêmeas HP não ocorreu alteração na quantidade de células uNK DBA⁺ do subtipo II, assim como do subtipo I. Já as células do subtipo III sofreram redução em relação ao grupo controle nas regiões 2 e 3. Concomitante à redução de células do subtipo III, ocorreu um aumento de células uNKa nestas regiões, indicando que as células uNKa sejam células uNK DBA⁺ do tipo III alteradas. Contudo, a dieta Hiperprotéica teve efeito menor no que diz respeito à geração de células uNKa do que o observado com as dietas hiperlipídica e hipercalórica, pois os animais HP possuíam número significativamente menor destas células quando comparados a esses dois grupos. Com relação ao subtipo IV, foi observado aumento deste nas regiões 1 e 2 dos sítios de implantação. Considerando a probabilidade do subtipo IV ser o subtipo senescente de células uNK DBA reativas como relatado por Paffaro e colaboradores (2003), a dieta hiperprotéica pode ter além de provocado alterações no subtipo II e III de células UNK DBA⁺, acelerado a senescência dessas células.

No que diz respeito à quantificação das células uNK no grupo RA, constatou-se aumento de células do subtipo II nas regiões 2 e 3, regiões onde normalmente são encontradas maior número de células do tipo III e IV, respectivamente, no 10^o ddg (PAFFARO et al, 2003). Já o número de células do subtipo III foi menor na região 1 e maior na região 3, em relação ao observado no grupo controle nestas mesmas áreas. É fundamental ressaltar que na região 2, onde normalmente há maior quantidade de células do subtipo III (PAFFARO et al, 2003), foi evidenciado aumento de células uNK DBA reativas do tipo II, embora não tenha ocorrido diminuição de células tipo III. Além disso, na região 3, onde ocorreu maior aumento de subtipo III, em relação ao controle, foi constatada diminuição de células uNK do tipo IV, as quais normalmente estão em maioria nesta área (PAFFARO et al, 2003).

Não existem dados na literatura quanto a atividade das células uNK frente a restrição alimentar. Mesmo quanto a ação citotóxica da NK circulantes frente a restrição alimentar, os dados na literatura são escassos e inconclusivos. Lieberman et al (1991), por exemplo, afirmaram que a atividade basal das células NK contra células tumorais é independente do estado nutricional do organismo em camundongos e que, mesmo após 3 semanas de restrição energética-proteica, a capacidade anti-tumoral destas células é preservada. Por outro lado, Saxena, Saxena e Alder (1984) mostraram que inicialmente a restrição calórica-proteica em fêmeas de camundongos C57B1/6 provoca aumento da atividade das células NK do

baço, entretanto, após 7 semanas de restrição, tal atividade decaiu para níveis normais e subnormais.

As uNK do subtipo II seriam a forma em diferenciação das células uNK DBA reativas que chegariam a se tornar células do subtipo III. O subtipo III, por sua vez, foi caracterizado como a forma diferenciada (PAFFARO JR et al, 2003), com alta síntese proteica, e as maiores responsáveis pela remodelação das artérias espiraladas que nutrem o embrião (CROY et al, 2006; BURKE et al, 2010), ou seja plenamente ativas. Sendo assim, o aumento em número das uNK do subtipo II e III em regiões próximas ao embrião implantado em animais do grupo RA pode indicar um atraso na diferenciação e/ou senescência das uNK nestes animais.

A imunocitoquímica para perforina nos grânulos das células uNK revelou que a maioria das células uNK presentes nos sítios de implantação de animais HL possuíam grânulos de aspecto vazio, com o interior sem marcação para perforina. Como descrito anteriormente, no grupo HL foi encontrada, também, grande quantidade de células uNKa e a presença dessas células poderia ser explicada pela possível existência de um quadro inflamatório, o qual provocaria alterações nas células uNK, semelhantes às observadas no protocolo de eutanásia cirúrgica intrauterina do embrião (ROMAN, 2001; COPI, 2006 e LIMA et al, 2012) ou protocolo que mimetize a infecção por meio da injeção intraperitoneal de LPS (LIPPE, 2007; ZAVAN, 2011).

Lima et al (2012) demonstraram que as células uNKa encontradas após a eutanásia embrionária possuíam grânulos com ausência de reatividade à perforina, enquanto Zavan (2011) demonstrou igual perda de reatividade em camundongos prenhes tratados com LPS, sugerindo que tanto a morte embrionária provocada cirurgicamente quanto a infecção mimetizada pelo LPS são capazes de ativar a citotoxicidade de uNK (LIMA et al, 2012; ZAVAN, 2011).

O LPS pode desencadear ativação de células que contenham receptores TLR4 (Toll-like receptor 4), um receptor que reconhece padrões moleculares associados à patógenos, como os ácidos graxos presentes nos lipídios que constituem o lipopolissacarídeo de *E.coli* (MUNFORD; HALL, 1986). Adicionalmente, Lee et al (2003) demonstraram que uma dieta com excesso de ácidos graxos pode levar a ativação de receptores TLR4 e, assim, desencadear a ativação de células imunológicas e, conseqüentemente, um processo inflamatório.

Além de ter sido reportado a presença de TLR4 em células uNK de humanos (ERIKSSON et al, 2014), no útero, há ainda, a presença de macrófagos (NAGAMATSU; SCHUST, 2010), células imunológicas que possuem receptores Toll-like receptor 4 e que podem ser capazes de ativar células NK através da liberação de citocinas (ABBAS, 2000). Nesse sentido, é possível que a dieta hiperlipídica possa ter ativado células imunológicas no útero e promovido uma resposta inflamatória e, assim, a ativação da citotoxicidade das células uNK desencadeando a liberação de perforina por essas células.

A análise de perforina do grupo HC mostrou que estes animais também apresentaram grande quantidade de células uNK com grânulos de perforina em seus interiores. Este grupo também apresentou um número significativamente alto de células uNK. Como proposto anteriormente, acredita-se que os eventos presentes no grupo HL, também possam estar relacionados às alterações evidenciadas em HC e isto ocorreria graças ao evento de neolipogênese. Portanto, é plausível supor que a menor reatividade dos grânulos para o anticorpo anti-perforina neste grupo também tenha sido consequência de um processo inflamatório desencadeado pela presença de grande quantidade de ácidos graxos no organismo de fêmeas HC.

No grupo HP verificou-se que houve diminuição da reatividade à perforina pelas células uNK, embora esta alteração pareça ter sido menos crítica do que foi observado nos grupos HL e HC, o que concorda com os resultados estereológicos obtidos nesse estudo, no qual verificamos que o número de células uNK em camundongos HP era menor que aqueles diagnosticados nos grupos HL e HC. Atualmente não há muitos dados na literatura a respeito de dieta hiperproteica e gestação. A ausência de dados torna inviável alusões às possíveis elos entre a alta ingestão de proteína e alterações nas células uNK, principalmente relacionando à promoção da liberação de perforina. Uma análise mais aprofundada das alterações ocorridas nos sítios de implantação de fêmeas HP é necessária para que se possa determinar a relação entre estes fatores.

Nas fêmeas do grupo RA não foi observado alteração quanto a reatividade de perforina nos grânulos das células uNK, em relação ao controle. Sendo assim, pode-se dizer que a restrição alimentar do 1º ao 10º dpg não foi um fator que suscitou a mobilização de perforina das células uNK.

Para melhor avaliar as alterações nas células uNK DBA reativas decorrentes da alteração nutricional, foi realizada a análise morfométrica dos 4 subtipos de

células uNK DBA⁺. O subtipo 1 nos grupos HC e HP apresentaram tamanho médio maior em relação ao controle. Já o subtipo II não apresentou alteração em nenhum dos 4 grupos de dieta alterada.

Resultado mais contundente no que se refere ao tamanho das células uNK, foi aquele observado nos animais submetidos à restrição alimentar. Nesses animais foi observada a diminuição em tamanho das células uNK DBA⁺ do subtipo III e IV e esses resultados sugerem que a privação parcial de alimento pode ter prejudicado o crescimento e/ou diferenciação das células uNK uterinas nesses animais.

A análise de imunocitoquímica para caspase 3-clivada mostrou que os sítios de implantação das fêmeas que consumiram dieta hiperlipídica e hipercalórica parecem ter exibido maior quantidade de células positivas para caspase 3-clivada. Como relatado, nossos resultados sugerem que estas duas dietas foram capazes de promover a liberação de perforina pelas células uNK. Sendo a perforina uma proteína que possui a capacidade de promover a apoptose através da formação de poros na membrana de células alvo (YOUNG et al, 1986; METKAR et al, 2002; THIERY; LIEBERMAN, 2014), acredita-se que a liberação dessa proteína possa estar relacionada à ativação da caspase-3 em células dos grupos HL e HC causando a apoptose. Aparentemente no grupo de fêmeas HC a ocorrência de eventos de apoptose foi maior do que nos outros grupos experimentais. Nesse sentido, pode-se supor que a ocorrência de apoptose esteja relacionada a provável perda gestacional evidenciada nas 4 fêmeas HC que não apresentaram sítios de implantação no 10º ddg. Além da evidencia de liberação de perforina, a qual pode ter promovido apoptose das células no grupo HC, dados da literatura demonstram que uma dieta rica em glicose pode induzir o processo de apoptose em diferentes tipos celulares (SHARMA et al, 2008; CHOI, 2011), sendo este, outro possível fator relacionado a alta presença de caspase 3-clivada nos sítios de implantação de fêmeas que consumiram dieta hipercalórica.

Com relação aos grupos HP e RA, o primeiro parece não ter apresentado alterações em relação ao grupo controle. Já o grupo de fêmeas que sofreram restrição alimentar, este aparenta ter apresentado mais células positivas para caspase 3-clivada do que foi observado no grupo RC. Belkacemi et al (2009) mostraram que ratas desnutridas podem apresentar ativação da via de sinalização de apoptose pela via mitocondrial, sendo este evento responsável pela diminuição no tamanho da placenta.

Como exibido nas imagens obtidas à partir da realização de imunocitoquímica para α -actina, os grupos HL e HC não apresentaram marcação para α -actina nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos de seus sítios de implantação. É sabido que células musculares lisas de vasos sanguíneos expressam receptores TLR4 (SANDBO et al, 2007), os quais podem ser ativados pelo elevado consumo de ácidos graxos (LEE et al, 2003). A ativação de TLR4 das células musculares lisas dos vasos sanguíneos por LPS promove a diminuição da expressão de genes relacionados à contração, como o gene da α -actina (SANDBO et al, 2007). É possível que a presença de lipídios provenientes da dieta oferecida às fêmeas do grupo HL tenha desencadeado a ativação de receptores TLR4 e promovido alterações semelhantes ao LPS nas células musculares lisas, o que culminou no relaxamento dos vasos nos sítios de implantação. Evento semelhante pode ter ocorrido no sítio de implantação das fêmeas do grupo HC.

Além destas observações, pode-se supor que a perforina liberada pelas células uNK esteja envolvida com a ausência de marcação para α -actina no vasos sanguíneos dos animais dos grupos HL e HC, uma vez que dados da literatura mostram que a perforina está relacionada a morte de células do músculo liso dos vasos sanguíneos para permitir tanto a migração quanto a proliferação de células endoteliais (HENDERSON et al, 1999).

Embora possa ter ocorrido a liberação de perforina por parte das células uNK do grupo HP, as células musculares lisas dos vasos sanguíneos apresentaram alta reatividade para α -actina, indicando um possível estado de contração dos vasos, o que também contraria a literatura, uma vez que esta sugere que a dieta hiperproteica pode promover diminuição da pressão arterial (CLIFTON; KEOGH, 2007).

Os resultados obtidos na análise imunocitoquímica para α -actina mostram que, aparentemente, grande parte das células morfológicamente semelhantes às células uNK não apresentaram marcação positiva para esta proteína em animais HL. Zavan (2011) demonstrou que os animais prenhes que receberam injeção intraperitoneal de LPS, após 4 horas da injeção, apresentaram células uNK com ausência de marcação para α -actina. Segundo este autor a diminuição da reatividade para α -actina nas células uNK após a aplicação de LPS sugere que ocorra desmontagem de contatos focais nestas células impedindo sua migração em um momento onde estas células podem ter seu metabolismo voltado para

responderem ao agente infeccioso por meio da ativação de sua citotoxicidade. Os dados presentes neste trabalho, o qual visou analisar a responsividade das células uNK às alterações nutricionais, corroboram com a hipótese sugerida por Zavan (2011), uma vez que, a ausência de marcação para α -actina nos sítios de implantação dos grupos hiperlipídica, hipercalórica e hiperproteíca pode estar relacionada à necessidade destas células de voltarem seu metabolismo para responderem às modificações promovidas no ambiente uterino.

A presença de forte reação para α -actina nas células musculares do miométrio de todos os grupos experimentais, inclusive àqueles que sofreram alteração na marcação para esta proteína nos vasos e células presentes na decídua basal, constituíram-se de uma importante comprovação da eficiência das reações para α -actina em nosso estudo, sendo, portanto, importantes como controle positivo interno. Além disso, esses resultados sugerem que o endométrio e as células ali presentes possam ser as mais atingidas pelas modificações na dieta, ou que, as células ali presentes, como as células uNK, respondem rapidamente na tentativa de manter a homeostase do ambiente uterino frente às alterações nutricionais.

7 CONCLUSÕES

Pelas avaliações procedidas nesse estudo, foi possível constatar que as rações hiperlipídicas e hipercalóricas foram as que provocaram alterações mais contundentes nas uNK reativas à Lectina DBA, com aparecimento de grande número de células uNKa (alteradas quanto à reatividade à DBA nas suas membranas e grânulos citoplasmáticos), mobilização da perforina em células de morfologia semelhantes às uNKa, grande expressão de Casp-3 em células da região mesometrial (indicativa de apoptose) e concomitante não reatividade dos vasos sanguíneos endometriais para α -actina (sugestivo de relaxamento dos vasos), sem contudo, alterar o comportamento desses animais nos parâmetros ansiedade, depressão ou retenção de memória.

Tal ausência de mudança nos parâmetros comportamentais pode ser notada também em animais tratados com a ração hiperprotéica. Em contrapartida, apesar de terem ocorrido células uNKa nos animais submetidos à dieta hiperproteica, as alterações na reatividade para DBA nas mesmas eram menos proeminentes, bem como, o número desse subtipo alterado de célula uNK era menor do que o observado em animais HL e HC. Adicionalmente, nesses animais, as alterações na reatividade ao anti-perforina em células semelhantes às uNKa e anti-caspase 3 clivada nas células endometriais, foram menos intensas que as observadas nos animais submetidos aos outros tipos de dietas. Além disso, os vasos de camundongos HP foram fortemente reativos ao α -actina diferente do observado nos demais grupos de dieta alterada.

Portanto, o conjunto de resultados obtidos em camundongos tratados com ração hiperprotéica até o 10^o ddg sugerem que esse tipo de dieta tem um menor impacto na resposta citotóxica das células uNK, com consequente diminuição da expressão de caspase-3 clivada (indicativa de apoptose) em células endometriais e diminuição do relaxamento α -actina-associado da musculatura dos vasos endometriais.

A restrição alimentar parcial até o 10^o ddg de camundongos, por sua vez, alterou o comportamento dos animais no parâmetro ansiedade, sendo que foi possível demonstrar o efeito ansiolítico dessa ração nesses animais. Contudo,

nossos resultados sugerem que os efeitos dessa restrição sobre a responsividade das células uNK DBA⁺ foi o menos proeminente de todos os outros tratamentos realizados em nosso estudo, visto que, não foram encontradas células uNK α , a imunoreatividade para perforina dos grânulos das uNK e para α -actina nos vasos endometriais foi idêntica àquela observada nos animais controle, apesar de haver reatividade de caspase-3 clivada no endométrio destes animais. Apesar disso, o insucesso na gestação da ordem de 50% nesses animais, caracterizando um tipo de resposta “tudo ou nada”, demonstrou que a privação parcial de alimento pode prejudicar a implantação embrionária ou a gestação, sugerindo que, apesar da ausência de alterações nas uNK DBA reativas nos animais comprovadamente prenhes deste grupo, a privação parcial de alimento não seria benéfica à gestação.

Portanto, esse foi um estudo prospectivo, que mostrou que as células uNK DBA reativas podem responder às alterações alimentares em camundongos até o 10^o ddg. Essa responsividade foi maior em animais tratados com ração hiperlipídica e hipercalórica e de uma maneira semelhante ao que ocorre em eventos que envolvem a inflamação ou morte embrionária induzidas respectivamente pela injeção de LPS e por meio de cirurgia. Contudo, a menor resposta de uNK DBA reativas em animais tratados com ração hiperproteica e submetidos à restrição alimentar, não significam, que essas dietas seriam benéficas à gestação.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PORBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. PerirhinalN-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neuroscience Letters**. v. 356, p. 191–194, 2004.

ACAR, N., USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine natural killer (*uNK*) cells and their missions during pregnancy: A review. **Acta Histochemica**. v. 113, p. 82-91, 2010.

AKAROLO-ANTHONY, S. N. et al. Pattern of dietary carbohydrate intake among urbanized adult Nigerians. **Int J Food Sci Nutr**. v. 64, n. 3, p. 292–299, 2013.

AKYOL A, LANGLEY-EVANS SC, MCMULLEN S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. **Br J Nutr**. v.102, n. 11, p.1601-10, 2009.

ALFARADHI, M. Z. e OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontiers in genetics**. v. 2, p. 1-13, 2011.

ANDREASYAN, K. et al. Higher maternal dietary protein intake in late pregnancy is associated with a lower infant ponderal index at birth. **Eur J Clin Nutr**. v. 61, n.4, p. 498-508, 2007.

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

ASHKAR, A. A. et al. Assessment of Requirements for IL-15 and IFN Regulatory Factors in Uterine NK Cell Differentiation and Function During Pregnancy. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 2937–2944, 2003.

ASSUNÇÃO, L, P. et al. Ganho ponderal e desfechos Gestacionais em Mulheres atendidas pelo programa de saúde da família em Campina Grande, PB, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, v. 10, n 3, p. 352-360, 2007.

ATHUKORALA ET AL. The risk of adverse pregnancy outcomes in women who are overweight or obese. **BMC Pregnancy and Childbirth**. Disponível em:

<<http://www.biomedcentral.com/1471-2393/10/56>> Acesso em: 23 maio, 2014, as 10:56.

ATKINSON, H. C. e WADDELL, B. J. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. **Endocrinology**, v. 136: p. 512-520; 1995.

AVIRAM, A. et al. Maternal obesity: Implications for pregnancy outcome and long-term risks- a link to maternal nutrition. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 115, p.6–10, 2011.

BALLEN, M. L. O. et al. Restrição protéica na prenhez – efeitos relacionados ao metabolismo materno. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 53, n. 1, p. 87-94, 2009.

BARLOW, S. M.; MORRISON, P. J.; SULLIVAN, F. M. Effects of acute and chronic stress on plasma corticosterone levels in the pregnant and non-pregnant mouse. **Journal of Endocrinology**. v. 66, p. 90-9. 1975.

BENCE, K. K. et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nat Med**. v. 12(8):917-24, 2006.

BELKACEMI, L. et al. Increased Placental Apoptosis in Maternal Food Restricted Gestations: Role of the Fas Pathway. **Placenta**. v. 30, p. 739–751, 2009.

BERG, B. N. Dietary restriction and reproduction in rat. **The Journal of Nutrition**. v. 87, p. 344-348. 1965.

BIANCO J, et al. Timecourse analyses addressing the acquisition of DBA lectin reactivity in mouse lymphoid organs and uterus during the first week of pregnancy. **Placenta**. v. 29, p.1009–1015, 2008.

BLUTHÉ, R.M. et al. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. **Eur. J. Neurosci**. v. 12, p. 4447–4456, 2000.

BRENNAN, J. et al. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: specificities and domain interactions. **J Exp Med**. v.183, n. 4, p. 1553-9, 1996.

BRUNTON, P. J.; RUSSELL, J. A. e DOUGLAS, A. J. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 20, p. 764–776, 2008.

BURKE S. D. et al. Uterine NK Cells, Spiral Artery Modification and the Regulation of Blood Pressure During Mouse Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 63, p. 472-481, 2010.

CARLINO, C. et al. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. **Blood**. v.111, p. 3108–1315, 2008.

CARVALHO AM. Tendência temporal do consumo de carne no Município de São Paulo: estudo de base populacional- ISA Capital 2003/2008. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2012.

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.

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

CHEN, X. Y. The effect of mifepristone on the peripheral blood natural killer cell's cytotoxicity and expression of CD94/NKG2A and NKG2D during the implantation phase. **Fertil Steril**. v. 93, n. 8, p. 2615-20, 2010.

CHEN, Z. et al. DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. **Biol Reprod**. v. 87, n.4, p.81, 2012.

CHIOSSONE, L. et al. In vivo generation of decidual natural killer cells from resident hematopoietic progenitors. **Haematologica**. v. 99, n.3, p. 448-457, 2014.

CHORILLI, M., MICHELIN, D.C., SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CHOI, S. S. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. **Nutrition Research and Practice**. v. 5, n. 3, p. 214-218, 2011.

COAN, P.M. et al. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. **The Journal of Physiology**. v. 588, p. 527-538. 2010.

CLIFTON, P. M.; KEOGH, J. Metabolic Effects of High-protein Diets. **Current Atherosclerosis Reports**. v. 9, p. 472–478, 2007.

COPI, C. Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomo-secretórios das células natural killer uterinas de camundongos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP. CAMPINAS. 2006.

CROY, B.A.; KASSOUF, S.A. Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 15, p. 51–69 1989.

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

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

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

DEGAKI, K.Y.; CHEN, Z.; YAMADA, A.T.; CROY B.A; Delta-like ligand (DLL)1 expression in early mouse decidua and its localization to uterine natural killer cells. **PLoS One**. v. 7, e52037, 2012.

DELGADO, S. R. et al. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a Natural Killer cell population, from the pregnant mouse uterus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 262-269. 1996.

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. **Placenta**, v. 31, p. 595-601, 2010.

DESAI, M. et al. Rat maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. 2014.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. v. 146, n. 10, p. 4192-9, 2005.

DOUGLAS, A. J. Mother-offspring dialogue in early pregnancy: Impact of adverse environment on pregnancy maintenance and neurobiology. **Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 35, p. 1167-1177, 2010.

EL-SAYYAD, H. I. et al. Effects of fried potato chip supplementation on mouse pregnancy and fetal development. **Nutrition**. v. 27, p. 343–350, 2011.

EHRMANN, D. A. Polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med**. v. 352: 1223–1236. 2005.

ERIKSSON, M. et al. TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium. **J Immunol**. v. 176, n. 10, p. 6219-24, 2006.

ESHRE Capri Workshop Group. Nutrition and reproduction in women. **Human Reproduction Update**. v.12, n. 3, p. 193–207, 2006.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, **Food and Agriculture Organization**. Disponibiliza dados sobre a agricultura mundial. Meat consumption 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html>.> Acesso em: 22 maio. 2014.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, **Food and Agriculture Organization**. Disponibiliza dados sobre a agricultura mundial. Disponível em: <<http://www.fao.org>.> Acesso em: 3 abril. 2014.

EVANS E; PATRY R. Management of gestational diabetes mellitus and pharmacists' role in patient education. **Am J Health-Syst Pharm**. v. 61, p.1460-5, 2004.

FAN, L. et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. **International Journal of Obesity**. v. 37, p. 254-62, 2013.

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

FERRARI, F.; GRABRIELLI, P. R.M.; MELLO, M. A. R. Restrição alimentar durante a gestação e suas implicações sobre o binômio mãe/feto. Um modelo experimental utilizando ratas jovens e adultas. **Alimentação e Nutrição**, v. 4, p. 45-56, 1992.

GAMBEL, P. et al. Characterization of immune effector cells present in early murine decidua. **Cell Immunology**. v. 93, p. 303–314, 1985.

GENN R. F. et al. Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 27, p.155-61, 2003.

GHEORGHE, C.P., et al. Placental gene expression responses to maternal protein restriction in the mouse. **Placenta**. v. 30, p.411–417, 2009.

GODFREY, K. et al. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. **BMJ**. v. 312, p. 410-414. 1996.

GUELINCKX I., et al. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. **Obesity Reviews**. V. 9, 140–150. 2008.

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

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

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.

HATTA, K.; VAN DEN HEUVEL; M.J., CROY, B.A. NK cells detect changes in adaptive immunity within mouse decidua from gestation day eight. **Placenta**. v. 30, p. 501- 506, 2009.

HEMMINKI E; STARFIELD B. Routine Administration of iron and vitamins during pregnancy: review of controlled clinical trials. **Br J Obstet Gynecol**. v. 85, p.404-10, 1978.

HENDERSON, E. L. Et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. **Circulation**. v. 99, n.1, p.96-104, 1999.

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

HIBY SE, REGAN L, LO W, FARRELL L, CARRINGTON M, MOFFETT A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, Cambridge, v. 23, p. 972–976, 2008.

HILLERER, K. M. et al. Exposure to chronic pregnancy stress reverses peripartum-associated adaptations: implications for postpartum anxiety and mood disorders. **Endocrinology**. v. 152, p. 3930 –3940, 2011.

HIYAMA M., et al. Differentiation of uterine natural killer cells in pregnant SCID (scid/scid) mice. **J Vet Med Sci**. v.73, p. 1337-1340. 2011.

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

HODGSON, K. et al. Dietary composition of carbohydrates contributes to the development of experimental type 2 diabetes. **Endocrine**. v. 43, p.447–451. 2013.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. v. 259, p.87-91, 1993.

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

INOUE, K. et al. Reduction of anxiety after restricted feeding in the rat: implication for eating disorders. **Biological Psychiatry**. v. 55, p. 1075-1081. 2004.

ISOSAKI, M.; CARDOSO, E. **Manual de Dietoterapia & Avaliação Nutricional**. 1 ed.São Paulo: Atheneu, 2006.

JACOBS, S. et al. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. **Physiol Behav.** v. 129, p. 280-6, 2014.

JOKHI, P. P. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **J Immunol.** v. 153, n.10, p. 4427-4435, 1994.

JONES, J. E. et al. Mechanisms of Fetal Programming in Hypertension. **International Journal of Pediatrics.** doi: 10.1155/2012/584831, 2012.

KALKUNTE, S. et al. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. **Am J Reprod Immunol.** v. 59, n. 5, p. 425-32, 2008.

KANITZ, E. et al. High and Low Protein: Carbohydrate Dietary Ratios during Gestation Alter Maternal-Fetal Cortisol Regulation in Pigs. **PLoS ONE.** v. 7, n. 12, p. e52748, 2012.

KARAKAS, S. E. et al. Responses of inflammatory markers to a low-fat, high-carbohydrate diet: effects of energy intake. **Am J Clin Nutr.** v. 83, p. 774 –9, 2006.

KARLHOFFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated Natural Killer cells. **Nature**, California, v. 2, p. 66-70, 1992.

KESKIN, D.B. et al. TGFbeta promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 104, n.9, p. 3378-83, 2007.

KING A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW.1998 Human uterine lymphocytes. **Hum Reprod Update.** v. 4, p. 480 – 485, 1998.

KING, A. et al. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors. **Placenta**, Cambridge, v. 21, p. 81-85, 2000.

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

KURODA, K. et al. Elevated periimplantation uterine natural killer cell density in human endometrium is associated with impaired corticosteroid signaling in decidualizing stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 98, p. 0000 – 0000, 2013.

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

KUZUYA T, NAKAGAWA S, SATOH J et al. Report of the Committee on the classification and diagnosis criteria of diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 55, p. 65-85, 2002.

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

LEANDRO, C. G. et al. Pode a atividade física materna modular a programação fetal induzida pela nutrição?. **Revista de Nutrição.** v. 22, p. 559-569, 2009.

LEE, J. Y. et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem.** v. 278, n. 39, p. 37041-51, 2003.

LI, X.F. et al. Angiogenic Growth Factor Messenger Ribonucleic Acids in Uterine Natural Killer Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 86, p. 1823-1834, 2001.

LIMA, P. D. Et al. Heterogeneity in composition of mouse uterine natural killer cell granules. **J Leukoc Biol.** v. 92, p.195-204, 2012.

LINNA, M. S. et al. Pregnancy, obstetric, and perinatal health outcomes in eating disorders. **American Journal of Obstetrics & Gynecology.** 2014.

LIANG, C.; De COURCY, K.; PRATER, M. R. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. **Metabolism Clinical and Experimental.** v. 59, p. 943–950, 2010.

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

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

LIEBERMAN, M. D. et al. Comparison of acute and chronic protein-energy malnutrition on host antitumor immune mechanisms. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**. v. 15, n. 1, p.15-21, 1991.

LIU, S. et al. A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake, and risk of coronary heart disease in US women. **Am J Clin Nutr**. v.71, p. 1455-61, 2000.

LIU X. et al. Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN γ can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG1. **Journal of Immunology**. v. 181, p. 449-463, 2008.

LIPPE, E. M. O. Avaliação da expressão de isoformas do óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária. 79f. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

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

MALE V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. **J Immunol**. v. 185, p. 3913–20, 2010.

MANASTER I, MANDELBOIM O. The unique properties of uterine NK cells. **Am J Reprod Immunol**. v. 63, n. 6, p. 434-44, 2010.

MASON LH, et al. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). **J Exp Med**. v.182, n. 2, p. 293-303, 1995.

MASON, L. H. et al. Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. **J Immunol**, Maryland, v. 160, p. 4148-4152, 1998.

MCQUEEN, K. L. et al. Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c. **Immunogenetics**. v. 48, n. 3, p. 174-83, 1998.

MCFARLIN, B. K.; FLYNN, M. G.; HAMPTON, T. Carbohydrate consumption during cycling increases in vitro NK cell responses to IL-2 and IFN- γ . **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 21, p. 202–208, 2007.

MCMILLEN, I. C. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v.102, p. 82-9, 2008.

METKAR, S. S. et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. **Immunity**. v. 16, n. 3, p. 417-28, 2002.

MIRANDA P.A.C., REIS R. et. al. Diabetes Mellitus Gestacional. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**, 2006.

MINANA-SOLIS MC, ESCOBAR C. Increased susceptibility to metabolic alterations in Young adult females exposed to early malnutrition. **Int J Biol Sci**. v. 3, p. 12-9, 2007.

MORAES, J. C. et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **Plos One**. v. 4, e 5045, 2009.

MUNFORD RS, HALL CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. **Science**. v. 10, n. 234, p. 203-5. 1986.

MUPPIDI, J.R.; TSCHOPP, J.; SIEGEL, R.M. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. **Immunity**. v. 21, p. 461–465, 2004.

MURPHY S. P. et al. Interferon Gamma in Successful Pregnancies. **Biology Reproduction**, v. 80, p. 848-859, 2009.

NAKAMURA, M. C. et al. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in Natural Killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. **J Exp Med**, Sanfrancisco, v. 185, p. 673-684, 1997.

NASCIMENTO, E.; SOUZA, S B. Avaliação da dieta de gestantes com sobrepeso. **Rev. Nutr.**, Campinas. v. 15, n. 2, p.173-179, 2002.

NTEEBBA, J. et al. Diet-induced obesity alters immune cell infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. **Molecular Reproduction e Development**. 2013.

NICHOLS BL, Nichols RN. Nutritional physiology in pregnancy and lactation. **Adv Pediatr**. v. 30, p. 473-515, 1983.

ODAKA, Y. et al. the Influence of a high-fat dietary environment in the fetal period on postnatal metabolic and immune function. **Obesity**. v. 18, p. 1688–1694. 2010.

OGANDO D. G., et al. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. **Reproduction**. v. 125, p. 95-110, 2003.

OHANA, O. et al. Risk factors for intrauterine fetal death (1988-2009). **J Matern Fetal Neonatal Med**. v. 24, p. 1079-83, 2011.

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

OLIVEIRA, J. E. D; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier; 1998.

PAFFARO JR, VA et al. Subset classification of mouse uterine Natural Killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta** 24:479-488. 2003.

PARIZZI, M. R.; FONSECA, J. G. M. Nutrição na gravidez e na lactação. **Rev Med Minas Gerais**. v. 20, n. 3, p. 341-353, 2010.

PARKER V.J., SOLANO M.E., ARCK P.C., DOUGLAS A.J. Diet-induced obesity may affect the uterine immune environment in early-mid pregnancy, reducing NK-cell activity and potentially compromising uterine vascularization. **Int J Obes**, Londres. v. 38, n. 6, p.766-74, 2014.

PARSLOW, T.G.; STITES, D.; TERR, A. **Imunologia Médica**. 10. ed. Rio da Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PASCALON, A.; BERTRAND, M. Effects of overall food restriction on embryo-fetal development in the rat. **Ann Rech Vet.** França. v.18, n. 4, p. 379-88, 1987.

PARKS, E. J. Effect of dietary carbohydrate on triglyceride metabolism in humans. **J Nutr.** v.131, p. 2772S-4, 2001.

PARKS, E. J. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. **Br J Nutr.** v. 87, n. 2, p. S247-53, 2002.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology.** v. 115, p. 1–112, 1989.

PINHEIRO, A. R. O.; FREITAS, S. F. T.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutr.**, Campinas. v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004.

PLOUGASTEL, B. F.; YOKOYAMA, W. M. Extending missing-self? Functional interactions between lectin-like NKrp1 receptors on NK cells with lectin-like ligands. **Curr Top Microbiol Immunol**, St Louis, v. 298, p. 77-89, 2006.

POHLMEIER WE1, Xie F, Kurz SG, Lu N, Wood JR. Progressive obesity alters the steroidogenic response to ovulatory stimulation and increases the abundance of mRNAs stored in the ovulated oocyte. **Mol Reprod Dev.** doi: 10.1002/mrd.22342. 2014.

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**, Berkeley, v. 19, p. 291-330, 2001.

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

ROSSO, P.; CRAMOY, C. Human nutrition: a comprehensive treatise (Nutrition Pre- and Postnatal Development). **Nutrition and pregnancy.** New York. Plenum Press. v. 1, 1979.

RAMOS, E. J. B. et al. Is obesity an inflammatory disease? **Surgery**. v. 134, p. 329-335. 2003.

SANDBO, N. et al. Downregulation of smooth muscle α -actina expression by bacterial lipopolysaccharide. **Cariovascular Res**, v. 74, p. 262-269, 2007.

SASAKI, A. ET AL. Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. **Neuroscience**. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.04.012. 2014.

SAXENA Q. B, SAXENA R. K, ADLER W. H. Effect of protein calorie malnutrition on the levels of natural and inducible cytotoxic activities in mouse spleen cells. **Immunology**. v. 51, n. 4, p. 727-33, 1984.

SCHULER, S. L. et al. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**. v. 32, p. 184-9, 2008.

SEAWARD, A.V.C. et al. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. **Human Reproduction**, doi:10.1093/humrep/deq236, 2010.

SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2013.

SHARMA, N. et al. High-sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. **J. Hypertens**. v. 26, n. 7, p. 1402–1410, 2008.

SHILS ME, OLSON JA, SHIKE M. **Modern nutrition in health and disease**. 10° ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 2006.

SLABBER, M. Effects of a low-insulin-response, energy-restricted diet on weight loss and plasma insulin concentrations in hyperinsulinemic obese females. **Am J C/in Nuir**. v. 60, p. 48-53, 1994.

SLATTERY, D. A. e NEUMANN, I. D. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. **Journal of Physiology**. v. 586, p. 377–385, 2008.

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

SOUZA, A. M. A. Influência da restrição alimentar no controle da pressão arterial sistêmica. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

STARKEY PM, SARGENT IL, REDMAN CW. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. **Immunology**. v. 65, n. 1, p. 129-34, 1988.

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

TAVARES, EP. Aspectos morfofisiológicos e comportamentais da gestação de camundongos após tratamento prévio com Danazol. Dissertação (Mestrado em Ciência Fisiológicas) - Instituto de Biomedicina, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

THIERY J., LIEBERMAN J. Perforin: a key pore-forming protein for immune control of viruses and cancer. **Subcell Biochem**. v. 80, p. 197-220, 2014.

TOWNSEND, K.L.; LORENZI, M.M.; WIDMAIER, E.P. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. **Endocrine**. v. 33, n. 2, p. 176-88, 2008.

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

TRICHES, R. M.; GIUGLIANI, E. R. J. Obesidade, práticas alimentares e conhecimentos de nutrição em escolares. v. 39, n. 4, p. 541-7, 2005.

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

VACCA P., et al. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 108, n. 6, p. 2402-07, 2011.

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

VITOLO, M.R. **Nutrição: da gestação ao envelhecimento**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, p. 44, 2008.

WALLACE, A. E.; FRASER, R.; CARTWRIGHT, J. E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. **Hum Reprod Update**. v. 18, n. 4, p. 458-71, 2012.

WANG, J. X.; DAVIES, M. J.; NORMAN, R. J. Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment. **Obes Res**. v. 10, p. 551–554, 2002.

WILLETT, W. C.; MANSON, J.; LIU, S. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**. v. 76, p. 274-80, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Genebra, Suíça. Disponibiliza informação sobre a saúde da população mundial. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 7 jun. 2012.

WORTHINGTON-ROBERTS, B.S.; WILLIAMS, S.R. **Nutrition in pregnancy and lactation**, 6° ed. Madison: Brown & Benchmark, p.513, 1997.

YOUNG, J. D. et al. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. **Cell**. v. 44, n. 6, p. 849-59, 1986.

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

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

ZAVAN, B. et al. Immunocytochemical studies of adhesion molecules on mouse UNK cells and their extracellular matrix ligands during mouse pregnancy. **The Anatomical Record**. v. 293, p.1081–1088, 2010.

ZAVAN, B. Aspectos morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por Ips durante a gestação de camundongos Dissertação (Mestrado em Ciência Fisiológicas) - Instituto de Biomedicina, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

ZAVAN B. et al. Splenectomy delays uterine natural killer cell recruitment to implantation sites and prolongs pregnancy in mice. **Anat Rec.** v. 295, p.1221-1228. 2012.

ZHANG, J. H. et al. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. **Placenta.** v. 30, p. 968–973, 2009.

ZHANG, J. et al. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell Mol Immunol**, Kingston, v. 1, p. 1-11, 2011.

ZAMBRANO E. et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. **J Physiol.** v. 566, p. 225–236. 2005.

ZHOU F. et al. Low-dose mifepristone increases uterine natural killer cell cytotoxicity and perforin expression during the receptive phase. **Fertil Steril.** v. 96, n. 3, p. 649-53, 2011.