

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- UNIFAL-MG

LISMARI PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA METIRAPONA SOBRE A GESTAÇÃO DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR**

Alfenas/MG

2018

LISMARI PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA METIRAPONA SOBRE A GESTAÇÃO DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR**

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.

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

S586a Silva, Lismari Pereira da
Avaliação dos efeitos da metirapona sobre a gestação de camundongos submetidos à restrição alimentar / Lismari Pereira da Silva. – Alfenas/MG, 2018.
73 f.: il. -
Orientador: Valdemar Antonio Paffaro Junior.
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2018
Bibliografia.
1. Gestação. 2. Metirapona. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio.
II. Título.

CDD- 573.4

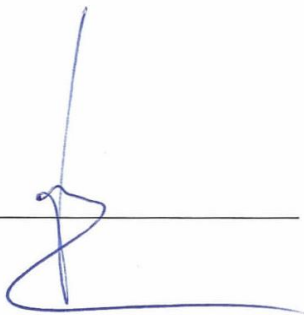
LISMARI PEREIRA DA SILVA

“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA METIRAPONA SOBRE A GESTAÇÃO DE
CAMUDONGOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO ALIMENTAR.”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre
em Biociências Aplicadas à Saúde pela
Universidade Federal de Alfenas . Área de
concentração: Fisiopatologia

Aprovado em: 24 / 10 / 2018

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Bruno Zavan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Mara Sandra Hoshida
Instituição: Universidade de São Paulo
-USP

Assinatura: Mara Sandra Hoshida

Dedico este trabalho a Deus, à Virgem Maria, aos meus pais, Edson e Cida e minha irmã Lívia, ao meu avô Belmiro; ao meu noivo Denis, por todo amor compreensão e apoio; e ao meu orientador, prof. Dr. Valdemar A.P.Junior, pela oportunidade concedida, por todos os ensinamentos, pela confiança e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser meu amparo, minha paz e meu refúgio em meio a tantas dificuldades. Por me chamar a viver com Ele e por Ele mais essa conquista, me devolvendo a dignidade de filha e serva, e me levando a ser algo que nunca imaginei que conseguiria. A Nossa Senhora do Carmo, por interceder por mim e por me ensinar a lutar pra ser melhor.

À meus pais, Edson e Cida, pela oportunidade concedida de cursar o mestrado. Pelo apoio, compreensão, conselhos, por todos os incentivos e por ser meu porto seguro. Em especial, agradeço ao papai pelas companhias diárias, por nossos almoços recheados de amor, por aquele café preparado com tanta alegria para me tirar o sono. Por me acompanhar até mesmo nos fins de semana pra vir ao biotério, por todas as nossas brincadeiras nas idas e vindas entre Campos Gerais e Alfenas. Sua companhia tornou essa jornada mais leve, e muito me ensinou a cada dia. Agradeço a mamãe por me apoiar, pelas orações, por entender a minha ausência e compreender minha fadiga, e pela amizade. Meu sustento diário e meu refúgio, sou eternamente grata a senhora mãe (minha indiazinha).

À minha irmã Lívia (Lilica), pela amizade, apoio e alegrias proporcionadas, por toda força e companheirismo. Seu jeito brincalhão muito me ajudou em momentos de fadiga e de desespero.

Ao meu avô João Belmiro, pelo amor e simplicidade, e por todos os ensinamentos. Sempre dizia: “eu tenho uma dó dessa menininha”. Sou eternamente grata por tudo que o senhor fez por nós, um segundo pai. Por tudo que aprendi com o senhor. Muitas das vezes, eu mesma digo: que dó dessa menininha. Mas sigo firme, para continuar sendo seu orgulho.

Ao meu noivo Denis, pela amizade, pelo amor e por ser meu amparo. Pelas incansáveis vezes que me ajudou, me acalmou e me acompanhou. Seu amor, sua parceria, sua amizade me aproximam de Deus e me fazem mais forte, me

impulsionam e me alegram a cada dia. Obrigada por tudo, juntos somos melhores. Como diz a música: nosso amor é um ensaio pra viver o céu.

À minha sogra D.Maria: pela simplicidade aconchegante, pelo apoio, pelas conversas, pelos gestos de carinho, pelos conselhos e momentos alegres.

Ao meu orientador prof. Dr. Valdemar A.P. Junior (Junior), pela oportunidade concebida, por tudo que me ensinou. Por me ensinar tanto, por ser tão paciente, por ser esse profissional dedicado e exemplar, por ser essa pessoa tão honesta e amiga. Aprendi muito além da pesquisa, aprendi como ser uma pessoa melhor.

A prof. Dr. Andrea A.M. Paffaro, por todo o aprendizado e colaborações. Um exemplo de profissional, com um coração generoso e acolhedor, o qual quero me espelhar.

A família Labaint, que ao longo desses dois anos se tornaram meus momentos diários de alegria, consolo e troca de experiências. **Aos funcionários,** Juliana, Neusa e Isabel, meu muito obrigado por todo zelo e dedicação.

Aos meus amigos de laboratório, Évila, Fernanda, Glícia, Rafael, Valdeci, Bruno, Renato, Josi, Rebeca, Raíne e Paulo, pelo aprendizado compartilhado e pela amizade. Em especial, agradeço imensamente a Évila, por toda ajuda e ensinamento. **Ao quarteto:** Junior, Évila, Bruno e Renato: pela amizade, pelo aprendizado, por nossas conversas alegres e extrovertidas, pelas brincadeiras. Vocês enriqueceram minha caminhada em todos os sentidos, e posso dizer que ganhei um pai (Junior) e três irmãos mais velhos (Évila, Bruno e Renato). Sou eternamente grata a vocês.

À prof. Dra. Márcia C.Bizzinoto, pelo aprendizado, pela experiência vivida durante o estágio docente. Por ser exemplo profissional e pessoal, e pelas contribuições feitas durante a qualificação.

Aos demais membros da banca de qualificação, prof. Dr. Marisa Ionta e prof. Dr. Roseli Soncini, pelas contribuições e considerações feitas.

À UNIFAL-MG, ao Programa de Pós Graduação em Biociências aplicadas a saúde e a secretária Adriana, por fornecerem condições para a realização desse trabalho.

À UNIFAL-MG, pelo apoio financeiro nos últimos oito meses de mestrado. **Ao Junior** por sempre ter soluções, mesmo em meio à falta de recursos financeiros, para que esse trabalho pudesse ser feito.

Ao Faria e a Adriana, pelas caronas que me ajudaram a chegar mais cedo em casa em dias exaustivos.

Aos camundongos, peças fundamentais para a pesquisa.

E a todos, que de alguma forma, contribuíram durante essa jornada. Muito obrigada!

Serei eternamente grata a todos vocês!

E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus (Romanos 8:28)

“Sua ternura abraça toda criatura “(Salmo 144)

“Vinde a mim, todos os que estais cansados e oprimidos, e eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo, e aprendei de mim, que sou manso e humilde de coração; e encontrareis descanso para as vossas almas. Porque o meu jugo é suave e o meu fardo é leve.”

(Mateus 11:28-30)

RESUMO

Na gestação ocorrem alterações neuroendócrinas e fisiológicas no organismo materno, sendo um período crítico a estímulos estressores. O modelo animal é amplamente utilizado para o estudo das alterações durante a gestação. Nesse microambiente uterino de mulheres grávidas, 70% dos leucócitos são linfócitos pertencentes a linhagem das natural killer uterinas (uNK). Tais células tem papel na manutenção da homeostasia na gestação e sua ausência pode estar relacionada a casos de aborto. Alterações nutricionais durante a gravidez podem prejudicar tanto a mãe quanto sua prole, sendo alvo de diversos estudos. O presente trabalho teve o fito de analisar o efeito da metirapona, um inibidor da síntese de glicocorticoides, e da restrição alimentar sobre a gestação de camundongos Swiss do 1º ao 10º ddg. Foram utilizados quatro grupos, animais alimentados *ad libitum* com ração controle (RC), animais alimentados com ração controle *ad libitum* e submetidos ao tratamento por metirapona (Met), animais submetidos a restrição alimentar (RA) e animais submetidos a restrição alimentar e tratados com metirapona (RA+Met). Foi procedido o estudo comportamental, da viabilidade gestacional, análises morfológicas e citoquímica por meio da lectina *Dolichos biflorus* aglutinina, a qual reage especificamente com a membrana plasmática e grânulos das uNK. As uNK reativas a lectina DBA (uNKDBA⁺) são conhecidas por sua atividade angiogênica o que permite a nutrição eficiente do embrião e da decídua, mantendo a homeostase durante a gestação. Nossos estudos indicam que a metirapona em concentrações altas (7,5mg/ml/Kg) causa aborto, enquanto em doses mais baixas (0,5mg/ml/Kg) não interfere na viabilidade gestacional. As uNK responderam ao tratamento de metirapona em animais alimentados *ad libitum*, provocando a gênese de células expressando baixa reatividade para lectina DBA (uNKDBA^{low}) semelhantes às observadas recentemente em estudos envolvendo agentes inflamatórios como dietas hiperlipídicas/hipercalóricas e lipopolissacarídeo de e-coli (LPS). Essa resposta das uNK vem de encontro ao seu papel angiogênico e pode ser importante para manutenção da homeostase uterina após o tratamento de um inibidor de síntese de glicocorticoides que provavelmente desregula o eixo HPA nesses animais. A restrição alimentar é capaz de causar comportamento do tipo ansiedade e prejudicar a diferenciação das células uNK DBA⁺ levando a perda gestacional de cerca de 75% dos animais submetidos a esse tratamento. Metirapona não foi capaz de bloquear nenhum destes efeitos da restrição alimentar em camundongos prenhes.

Palavras chave: Gestação. Restrição alimentar. uNK. Metirapona.

ABSTRACT

Gestation has neuroendocrine and physiological changes in the maternal organism, being a critical period to stressful stimuli. The animal model is widely used for the study of alterations during pregnancy. In the women uterine microenvironment, 70% of leukocytes are lymphocytes belonging to the uterine natural killer (uNK) lineage. Such cells play a role in the maintenance of pregnancy homeostasis and its absence is directly related to abortion. Nutritional changes during pregnancy can cause damages for both mother and offspring and are the subject of several studies. The aim of the present study was to analyze the effect of metirapone, an inhibitor of glucocorticoid synthesis, and dietary restriction on gestation of Swiss mice from 1 to 10⁰ ddd. Four groups were used: animals fed ad libitum with control ration (RC), animals fed control ration ad libitum and submitted to treatment by metirapone (Met), animals submitted to food restriction (RA) and animals submitted to food restriction and treated with metirapone (RA + Met). Behavioral, gestational viability, morphological and cytochemical analyzes were performed through the Dolichos biflorus agglutinin lectin, which reacts specifically with the plasma membrane and uNK granules. Such uNK cells reactive to the lectin DBA (uNKDBA⁺) are known for their angiogenic activity which allows the efficient nutrition of the embryo and the decidua to maintain the homeostasis of the uterine microenvironment during pregnancy. Our studies indicate that metirapone in high concentrations causes miscarriage, whereas at lower doses (0.5mg / ml / kg) it does not change gestational viability. UNK were able to respond to metirapone treatment in animals fed ad libitum by inducing the genesis of cells expressing low reactivity to lectin DBA (uNKDBA^{low}) similar to those observed recently in studies involving inflammatory agents such as hyperlipid / hypercaloric diets and e-coli lipopolysaccharide (LPS). This uNK response is consistent with its angiogenic role and may be important for maintenance of uterine homeostasis after treatment of a glucocorticoid synthesis inhibitor that probably deregulates the HPA axis in these animals. The food restriction caused anxiety-like behavior and impaired the differentiation of uNK DBA + cells, leading to gestational loss of about 75% of the animals submitted to this treatment. Metirapone did not prevent any of these effects of dietary restriction in pregnant mice

Keywords: Gestation. Food restriction. uNK. Metirapone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Grupos experimentais e respectivos tratamentos	28
FIGURA 2 - Organização dos grupos experimentais e tamanho das amostras.	28
FIGURA3 - Imagens macroscópicas de sítios prenhes no 10 ^o d.d.g.....	35
FIGURA 4- Ganho de peso dos animais prenhes do 1 ^o ao 10 ^o ddg.....	36
FIGURA 5 - Estudo Comportamental no teste de campo aberto.....	38
FIGURA 6- Viabilidade gestacional e peso da adrenal	40
FIGURA 7- Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação submetidos a Citoquímica com lectina DBA.....	42
FIGURA 8- Análise morfométrica do tecido adiposo marrom.....	43
FIGURA 9- Gráfico do número de animais prenhes e não prenhes diagnosticado à termo.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrófico
BAT	-	Tecido adiposo marrom
Bcl-XL	-	Proteína antiapoptótica da família Bcl-2
BSA	-	Albumina Bovina Sérica
CD	-	Cluster de diferenciação
CRH	-	Hormônio liberador de corticotropina
CYP11B1	-	11 beta hidroxisteróide
DAB	-	Diaminobenzidina
DBA	-	Dolichos biflorus aglutinin
Ddg	-	dia de gestação
DOCA	-	Deoxicorticosterona
HE	-	Hematoxilina e Eosina
HPA	-	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IL-6	-	Interleucina 6
KIR	-	Receptor tipo imunoglobulina
LPS	-	lipopolissacarídeo
Ly49	-	Receptor tipo lectina
Met	-	Metirapona
MMP2	-	Metaloproteinase de matriz 2
NKG5	-	Granulosina
NKp	-	Receptor Natural de citotoxicidade
PGF	-	PROSTAGLANDINA F
PLG-F	-	Fator de crescimento placentário
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RA	-	Restrição alimentar
RA+Met	-	Restrição alimentar+Metirapona
RC	-	Ração controle
TGF- β	-	Fator de crescimento transformante beta
UCP-1	-	Proteína uncopolina 1
uNK	-	Natural Killer Uterina
VEGF	-	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	PERÍODO GESTACIONAL.....	17
2.2	MICROAMBIENTE GESTACIONAL E AS CÉLULAS uNK.....	18
2.3	A RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA GESTAÇÃO.....	21
2.4	O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA) NA GESTAÇÃO.....	23
2.5	METIRAPONA- UM INIBIDOR DE SÍNTESE DE GLICOCORTICÓIDES.....	24
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	MATERIAL E MÉTODO.....	28
5.1	Animais.....	28
5.2	Organização dos Grupos Experimentais.....	28
5.3	GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES.....	30
5.4	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO.....	30
5.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL E DO PESO DA ADRENAL NO 10º ddg.....	31
5.6	PROCESSAMENTO PARA EMBEBIÇÃO EM PARAFINA.....	31
5.7	CITOQUÍMICA COM LECTINA DBA.....	31
5.8	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO.....	33
5.9	ANÁLISE DA PRENHEZ A TERMO, TAMANHO E PESO DA PROLE.....	33
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
6	RESULTADOS.....	34
6.1	ESTUDO NA DOSE INICIAL DE 7,5 MG/ML/KG DE MET EM SALINA.....	34
6.2	ESTABELECIMENTO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE MET.....	34
6.3	ANÁLISE DE GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES.....	37
6.4	ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	38
6.5	ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL E DO PESO DA ADRENAL NO 10º ddg.....	40

6.5.1	Análise morfológica e citoquímica	42
6.6	MORFOMETRIA TECIDO ADIPOSEO MARROM	44
6.7	ANÁLISES DA PREENHEZ A TERMO, TAMANHO E PESO DA PROLE.	45
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas cresceram os estudos sobre a gestação, elucidando parte das alterações que ocorrem nesse período classificado como um período crítico. Sabe-se que há modulações no sistema imune para implantação e desenvolvimento do embrião, que não é geneticamente idêntico a mãe.

Estudos em modelos animais permitiram a elucidação de partes dos mecanismos gestacionais, dos efeitos externos prejudiciais ao embrião, bem como os componentes imunes desse microambiente gestacional. As células natural killer uterinas (uNK), componentes imunes inatos do organismo materno, são responsáveis pela manutenção de uma gestação saudável, sendo ativadas mediante insultos a gestação. Tais insultos são fatores externos que prejudicam a nutrição e desenvolvimento do embrião/feto.

Evidências apontam que dentre os fatores externos que prejudicam a gestação, os fatores nutricionais tem ganhado importância, sendo extremos opostos: a desnutrição e a obesidade, como já descrito pela Organização Mundial da Saúde. Os fatores nutricionais interferem na gestação causando efeitos precoces na gestação como baixo peso ao nascer, doenças neonatais, patologias gestacionais como pré-eclâmpsia e abortos recorrentes; e alterações tardias na prole como obesidade na vida adulta, síndrome metabólica e alterações psiquiátricas.

A desnutrição materna gestacional, objeto de estudo de muitos pesquisadores, ocasiona uma redução da viabilidade gestacional e alterações na prole, bem como alterações nos componentes uterinos e organismo materno. A desnutrição materna em todas as suas formas atua diretamente como um estímulo estressor, ativando a resposta via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, provocando adaptações no organismo materno e microambiente gestacional.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, responsável pela resposta ao estresse, o faz pela síntese e secreção de cortisol (humanos) e corticosterona (roedores). Fármacos que inibem a síntese de cortisol, inibindo diretamente esse eixo, vem sendo utilizado durante a gestação como possíveis inibidores do estresse durante a gestação.

O uso de um inibidor de glicocorticóides , Metirapona, em conjunto com a restrição alimentar durante a gestação , reverteu os efeitos da restrição alimentar quando utilizados na segunda metade da gestação.

Corroborando com os efeitos descritos de a restrição alimentar materna em modelos de roedores, o presente estudo tem como fito avaliar os efeitos da Metirapona em conjunto com a restrição alimentar do 1º ao 10º dia de gestação, já que não existem estudos na literatura que utilizem esse fármaco no início da gestação.

Sabe-se que a restrição alimentar causa um atraso na diferenciação e senescência das uNKs(SALLES 2014), e que não existem relatos do efeitos da Metirapona sobre as Unks. Sendo o pico dessas células no 10º dia de gestação(PAFFARO 2003), é relevante avaliar os efeitos da restrição alimentar e da Metirapona até o 10º dia de gestação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERÍODO GESTACIONAL

A gravidez origina alterações neuroendócrinas e fisiológicas que permitem o desenvolvimento fetal e o parto Voltolini, C. Petraglia, F.(2014) incluindo alterações nos níveis hormonais e mecanismos de controle, que são cruciais em proporcionar um ambiente favorável para o crescimento celular e maturação (LIU, J.H.; RELAR, R.W., 1999).

Durante a gestação, trocas nutricionais e gasosas ocorrem na placenta, interface física entre mãe e feto para garantir o crescimento, o desenvolvimento e a sobrevivência intrauterina. De maneira a permitir essa troca e nutrição ocorrem vastas alterações no organismo materno, que vão desde o aumento do volume sanguíneo, aumento de células vermelhas, redução da hemoglobina e um aumento da necessidade de ferro, uma vasodilatação periférica, aumento da demanda de oxigênio e alterações hormonais que incluem o aumento dos hormônios tireoidianos, gonadotrofina coriônica humana, deoxicorticosterona, aldosterona e relaxina (SOMA-PILLAY, P. et al., 2016). A placenta induz modificações circulatórias que acabam por direcionar ao útero maior volume de sangue (HVIID, 2006).

O estudo dos mecanismos biológicos da gravidez contribui para aumentar os conhecimentos sobre a tolerância imunológica e as condições fisiológicas desse processo (SARAFANA et al., 2007). O período gestacional é considerado um período crítico no desenvolvimento já que alterações nessa fase ocasionam alterações precoces e na vida adulta do feto. Tais alterações caracterizam um desequilíbrio na homeostasia intrauterina que provocam adaptações no desenvolvimento fetal bem como no ambiente uterino que podem ocasionar alterações no desenvolvimento fetal desde a organogênese, baixo peso ao nascer, aumento de natimortos até alterações na vida adulta como a obesidade, resistência à insulina, doenças cardíacas e alterações psiquiátricas (BARKER&OSMOND 1986; FALL et al., 1995; LANGLEY-EVANS 2006).

A Organização Mundial da saúde (WHO), em 2013, relatou 101 milhões de crianças desnutridas e com baixo peso antes dos cinco anos de idade e 43 milhões de crianças obesas. Dentre as causas da mortalidade infantil (6,9 milhões de crianças antes dos cinco anos de idade), a desnutrição gestacional foi a causa de um terço dessa mortalidade.

Diante das consequências das alterações gestacionais, cresceram os estudos acerca desse processo. Corroborando com os dados estatísticos, o uso do modelo animal permitiu a elucidação dos mecanismos que ocorrem durante a gestação bem como a descoberta de interferentes nesse processo e as consequências para o feto. O uso de roedores para o estudo da gestação é amplamente utilizado pela semelhança com o humano- presença de placenta hemocorial-pela fácil reprodutibilidade, pelo ciclo reprodutivo curto- diferente de humanos, roedores possuem o chamado ciclo estral que dura de 4 a 5 dias, e a gestação é de apenas 20-21 dias, e por possuírem características genéticas definidas que facilitam o planejamento do estudo (COOKE, P.S. et al., 2013; NATALE, D.; PARAST, M.M; SONCINI, F., 2015.)

2.2 MICROAMBIENTE GESTACIONAL E AS CÉLULAS uNK

O progresso gestacional requer alterações no útero como forma de se propiciar um ambiente que permita a implantação do embrião que contém material genético materno e paterno- semialogênico (WATANABE et al., 2014.).

A decidualização consiste na diferenciação dos fibroblastos endometriais e alterações na morfologia celular originando a decídua, tecido transitório gestacional. Dessa maneira tem-se no microambiente gestacional componentes maternos imunes, dentre eles: as células natural killer uterinas (Unk), macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T (JONES, R. et al., 2006; ERLEBACHER 2013).

A relevância clínica da adaptação vascular uterina materna durante a gravidez é destacada pelo fato de sua alteração estar associada a diversas patologias gestacionais comuns, incluindo restrição do crescimento intrauterino, diabetes gestacional e pré-eclampsia (OSOL et al.,2009).

Para que não haja rejeição desse embrião ocorre uma modulação da imunidade com consequente supressão das células T e redução da atividade inflamatória, o que justifica o fato dos linfócitos T e B serem minoria durante a gestação (MICHELON et al., 2006; WATANABE et al., 2014).

As células natural killer são linfócitos da imunidade inata que estão presentes em diversos tecidos como gânglios linfáticos, timo, baço, fígado e útero (YOKOYAMA et al., 2013). As células natural killer expressam marcadores de superfície em sua membrana, sendo que as células do sangue periférico expressam baixas concentrações de CD56 e alta concentração de CD16- e possuem função citotóxica; desempenham respostas imunes inatas a patógenos bem como estimulam respostas imunes adaptativas (KIESSLING, R; KLEIN, E; WIGZELL, H., 1975; HOROWITZ et al., 2012; VIVIER et al., 2011).

Já as células natural killer uterinas, presentes na decídua, apresentam alta concentração de CD56 e baixa concentração de CD16- são menos citotóxicas que as periféricas Koopman et al.(2003), se correlacionam com a manutenção da homeostasia gestacional e produção de citocinas, secreção de fatores angiogênicos que contribuem para a decidualização (HANNA et al., 2006).

Células natural killer uterinas são responsáveis pelo direcionamento e formação do suporte vascular durante a gestação. Essas células secretam citocinas que estimulam a angiogênese, bem como a remodelação tecidual sendo que a deficiência de algum desses fatores está relacionada com a pré-eclampsia, aborto espontâneo, restrição do crescimento intrauterino e trabalho de parto prematuro (RATSEP et al., 2014). Apresentam grânulos com proteínas líticas (perforinas e granzinas), cuja liberação está diretamente relacionada com a atividade citolítica (ANDONIOU et al., 2006).

Estudos imuno-histológicos revelaram que as células uNK expressam numerosos fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular - fator A (VEGFA), VEGFC, PGF, metaloproteinase da matriz 2(MMP2), fator transformador de crescimento beta 1(TGFB1) e NKG5 (atualmente conhecido como granulósina) . Quando as uNK estão ausentes em camundongos transgênicos, sua ausência é capaz de provocar deficiência no relaxamento das artérias espiraladas uterinas causando problemas na decidualização e placentação (ASHKAR et al., 2003).

A interação das células uNK com outras populações celulares ocorre através de receptores de membrana, classificados como ativadores ou inibidores, dependendo se a atividade lítica é disparada ou não após a ligação ao receptor. Os principais receptores inibitórios em camundongos são Ly49 e CD94-NKG2, sendo expressos nas uNK maduras, enquanto os receptores de ativação são: NKRP1A, ENKRP1C, DX5, CD2,2B4, CD69, Ly49D, Ly49H, Nkp46 e NKG2D (CARAUX et al., 2006). A ausência de receptores Ly49 implica complicações gestacionais prejudicando a remodelação vascular, angiogênese e placentação (LIMA et al., 2014).

A presença das uNK em humanos e roedores difere em relação ao seu pico, uma vez que em humanos essas células estão presentes no final da fase secretória e se correlacionam com a remodelação tecidual no período menstrual ou a manutenção de uma gestação saudável. Em roedores, pela presença de um ciclo curto (4-5 dias) e ausência de um ciclo menstrual, as uNK estão presentes apenas durante a gestação entre o 5º ddg até o 18º ddg já que a gestação de roedores é de apenas 21 dias (NATALE, D.; PARAST, M.M.; SONCINI, F., 2015).

Paffaro et al., (2003), por meio de estudos citoquímico utilizando a lectina *Dolichos Biflorus* aglutinina (DBA), caracterizou quatro subtipos de células uNK. O subtipo I é pequeno, apresenta reatividade para a lectina, núcleo com heterocromatina e ausência de grânulos citoplasmáticos; o subtipo II é maior em relação ao subtipo I, apresenta também reatividade para Lectina DBA e possui poucos grânulos citoplasmáticos; o subtipo III possui forte reatividade para Lectina DBA, núcleo com eucromatina e nucléolo evidente, citoplasma com grânulos condizente com um tipo celular diferenciado ou maduro; já o subtipo IV é maior que os demais, porém apresenta marcação para Lectina DBA descontínua, e seu citoplasma possui grânulos com aspecto extraído sugestivo de senescência.

Um quinto subtipo de uNK, nomeado DBA^{LOW}uNK, foi descrito por Zavan et al., (2016); Salles (2014). A DBA^{LOW}uNK apresenta marcação descontínua para a lectina DBA e o citoplasma possui grânulos vazios. Mediante insultos a gestação, as uNK podem ser ativadas e liberar seu conteúdo citoplasmático, que consistem em proteínas relacionadas a morte celular - perforinas e granzinas - para manutenção da homeostasia gestacional (XIONG et al., 2013).

2.3 A RESTRIÇÃO ALIMENTAR NA GESTAÇÃO

Está bem estabelecido que a perturbação pré-natal devido a alterações maternas nutricionais relacionadas pode ter efeitos deletérios sobre o futuro da saúde do feto (LANGLEY-EVANS 2006).

Estudos demonstram que a hipertensão na vida adulta é causada farmacologicamente por exposição à glicocorticóides durante o período gestacional ou fisiologicamente por desnutrição materna (MUN) (KORRAM et al., 2015).

Modelos de estudos que avaliam os efeitos da restrição alimentar vem sido utilizados a décadas para se elucidar o mecanismo dessas alterações nutricionais em fêmeas virgens e gestantes. Os modelos de restrição alimentar diferem em relação ao(s) nutrientes(s) que são restritos e ao tempo de restrição: restrição de todos os nutrientes, a restrição proteica, a restrição de lipídios ou de outro nutriente específico. Em relação ao tempo tem-se o modelo de restrição alimentar aguda e crônica. A restrição alimentar crônica é uma causa importante de disfunções metabólicas, imunes e neuroendócrinas (GIOVAMBATISTA et al., 2000).

A restrição alimentar calórica 50% antes da gravidez ocasionou redução do peso da prole masculina (ARAMINAITE, V. et al., 2014). A restrição alimentar altera o labirinto placentário Gao, H et al., (2010), a histologia ovariana, induzindo o desenvolvimento de folículos ovarianos anormais, causando puberdade precoce na prole e declínio da expectativa de vida reprodutiva (HARRATH, A.H. et al., 2017).

A restrição alimentar crônica figura como um estímulo estressor uma vez causou um aumento da densidade volumétrica das células adrenocorticotróficas e um aumento dos níveis de ACTH (MILOSEVIC, V.Lj et al., 2011). Fêmeas submetidas a restrição alimentar por 6 semanas apresentaram um aumento de interleucina -6(IL-6), ocasionando um estímulo na hipófise anterior. (SPANGELO & MACLEGO 1990; USKOVIC et al., 2009).

A restrição alimentar materna durante a gravidez é fisiologicamente um estímulo estressante para a atividade adrenocortical, incluindo a produção de corticosteroides e a modulação de genes responsivos ao estresse (GUARNIERI, JD. et al. 2011; MITCHELL et al., 2009).

A desnutrição materna influencia diretamente a função das mitocôndrias sobre a prole em diversos tecidos, como o fígado, pâncreas, rim e músculo esquelético. O

músculo esquelético compõe cerca de 40-50% da massa corporal e é o principal local de utilização de glicose e de ácidos graxos, desempenhando um papel importante na prevenção da obesidade e diabetes tipo 2. Pesquisas demonstraram que a exposição materna a uma dieta de baixa proteína durante a gravidez diminuiu o conteúdo de DNA mitocondrial e reduziu a atividade da citrato sintetase, e ainda alterou a expressão do gene mitocondrial no fígado e no músculo esquelético da prole (JOUSSE et al., 2014).

Recentemente Salles(2014) demonstrou que a restrição alimentar do primeiro ao 10º dia de gestação (ddg) apresentou uma alteração de comportamento onde os animais submetidos à restrição alimentar apresentaram maior exploração dos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado representativo de uma redução do comportamento semelhante a ansiedade. O mesmo autor revelou que 50% desses camundongos tiveram perda gestacional, enquanto os outros 50% tiveram gestação aparentemente normal, e a prole dos animais submetidos a restrição alimentar era menor em relação ao controle.

Resultados semelhantes foram prospectivamente obtidos por Berg (1965) que submeteu ratas à restrição alimentar de 25%, 50% e 70%. Berg (1965) revelou que algumas ratas em seu experimento tiveram uma gestação bem sucedida e com ninhadas de tamanho normal, enquanto outras não apresentavam sítios de implantação. Pascalon e Bertrand (1987), realizando restrição alimentar de 70%, 50% e 25%, descreveram um fenômeno de ~~tudo~~ ou ~~nadal~~ com relação ao nascimento da prole e, quando havia morte embrionária precoce, esta ocorria em sua maioria antes do 10ºddg.

Além disso, Salles (2014) demonstrou que a restrição alimentar durante a gestação de camundongos provocou o aumento da expressão de caspase 3 ativada no microambiente uterino, atrasou a diferenciação e senescência das uNK, bem como, diminuiu seu tamanho, contudo sem modificar a expressão de perforina pelas uNK ou actina-alpha nos vasos sanguíneos.

Ainda, existem relatos na literatura sobre os efeitos da RA sobre o tecido adiposo marrom (BAT), tecido localizado na região posterior do pescoço responsável pela manutenção da temperatura corporal. A RA em machos (65%) reduziu a massa de tecido adiposo marrom e as proteínas mitocondriais (ROTHWELL, N.J; STOCK, M.J., 1982).

2.4 O EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA) NA GESTAÇÃO

A resposta neuroendócrina ao estresse se dá pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal via secreção de hormônios que restauram as condições fisiológicas. Os componentes desse circuito neuroendócrino compreendem o hipotálamo e o hormônio liberador de corticotropina (CRH); a hipófise e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); a glândula adrenal e o cortisol- que em conjunto modulam o metabolismo, o sistema imune e cardiovascular (BRUNTON, P.J; RUSSEL;J. A.; 2008).

De maneira análoga ao que acontece com o sistema imune, o eixo HPA está parcialmente reduzido no início da gestação neutralizando o impacto do estresse e promovendo o sucesso da gestação. Por outro lado, há um aumento dos hormônios desse eixo no final da gestação preparando o feto e o organismo materno para a parturição (PETRAGLIA, F.; VOLTOLINI, C.; 2014).

Na presença de um estímulo estressor, os neurônios hipofisiotrópicos do hipotálamo são estimulados a sintetizar e secretar o CRH, que irá modular receptores sinérgicos da hipófise anterior estimulando a síntese e secreção de ACTH; ACTH irá atuar sobre a zona fasciculada da glândula adrenal (suprarrenal) estimulando a síntese de glicocorticóides (BRUNTON, P.J; RUSSEL; J.A; 2008).

Os glicocorticóides são hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (GOODMAN & GILMAN, 2003).

O papel dos glicocorticóides é essencial durante o desenvolvimento fetal uma vez que promovem a maturação do pulmão e da produção de surfactante necessário para a função do pulmão extrauterina (PROUD; SUBAUSTE; WARD; 1994). Os glicocorticóides também promovem o desenvolvimento do cérebro iniciando a maturação correta, remodelação dos axônios e dendritos, e afetam diretamente a sobrevivência celular (MEYER, 1983; YEHUDA et al , 1989).

Johnson et al., (2007) mostraram que, além da redução do peso fetal, a administração de glicocorticóides em macacos *Rhesus*, houve redução de múltiplos

órgãos incluindo o pulmão, fígado, cérebro, pâncreas e glândulas suprarrenais.

Os glicocorticóides modificam a fisiologia do sistema nervoso em vários níveis, interferindo com processos moleculares envolvidos na modulação da resposta neuroinflamatória, neurodegeneração, viabilidade neuronal e equilíbrio celular e metabólico. Os glicocorticóides ainda modificam a reatividade emocional, comportamento global e cognitivo (KALAFATAKIS et al., 2016).

Por outro lado, exposição materna a elevadas concentrações de glicocorticóides altera o desenvolvimento fetal. O excesso de glicocorticóides ocorre fisiologicamente quando há redução da expressão da enzima placentária 11beta hidroxisteróide desidrogenase ou quando a mãe é exposta a algum tipo de estresse (HARRIS 2010).

Os glicocorticóides na circulação fetal também afetam o metabolismo de glicose, a deposição e a mobilização de glicogênio nos tecidos fetais durante a gestação (FOWDEN & FORHEAD, 2009).

2.5 METIRAPONA- UM INIBIDOR DE SÍNTESE DE GLICOCORTICÓIDES

O fármaco Metirapona (2-metil-1,2-bis-(3-piridil)-1-propapnolona) (Met) foi desenvolvido como um potencial inibidor de esteroidogênese (LIDDLE et al., 1958) possui um mecanismo de ação rápida e uma meia-vida curta de cerca de 2 horas. Nos EUA é usada principalmente como terapia adjuvante com outros inibidores de esteroidogênese com terapia de radiação (SHARMA et al., 2015).

Os glicocorticóides são sintetizados na zona fasciculada da adrenal, e requer a ação de cinco enzimas diferentes pertencentes à família do citocromo P450(CYP11A1/CYP 11 B1/ CYP17/ CYP21A2/ HSD3B2. A Met inibe a 11 beta hidroxilase (CYP11B1) inibindo a fase final de síntese de glicocorticóides, reduzindo os níveis de cortisol e aldosterona, e elevando os níveis de 11- Deoxicortisol e desoxicortisona (DOCA) (CANINI et al., 2009).

Foi demonstrado que a administração de Met aboliu os efeitos dos glicocorticóides após a administração de LPS em fêmeas grávidas, e ainda alterou o

equilíbrio de citocinas sistêmicas (por exemplo, IL-6). (BRENT et al., 2011).

A Met melhora a hipertensão arterial e a redução do número de néfrons causados pela restrição proteica (HABBIB, S. et al. , 2011).

Paek et al.,(2014), constatou que a Met reverte os efeitos da sinalização Wnt e diferenciação de fibroblastos, ambos efetuados pelos glicocorticóides. A restrição alimentar provoca um aumento do nível de glicocorticóides que estimulam a via Wnt. A Met estimula a expressão de beta-catenina, um mediador da via Wnt, bem como aumenta a expressão de fibronectina e calponina. A Met reverte os efeitos da restrição alimentar sobre a alveolarização atuando diretamente sobre a via Wnt e seus mediadores.

A administração de Met no final da gestação resultou em um aumento de ACTH na circulação e crescimento adrenal, porém, as concentrações de cortisol plasmático não sofreram alterações em decorrência do uso de Met. A Met atua no feedback negativo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e que baixas concentrações de cortisol intracelulares estão associadas com o aumento da adrenal e diminuição da expressão do RNAm 11bHSD2, tais resultados sugerem que as ações do cortisol e do ACTH são necessárias para o crescimento da adrenal bem como a esteroidogênese, essenciais na transição pré-parto e nascimento (WARNES et al. ,2003).

Eventos de estresse influenciam diretamente a produção da proteína Bcl-xL nos neurônios serotoninérgicos do mesencéfalo, sendo que após o estímulo os níveis de RNAm Bcl-xl aumentam. Em uma situação de estresse em que se administrou Met os níveis de RNAm diminuíram revertendo dos efeitos dos glicocorticóides. (SHISHKINA et al., 2015).

Em conjunto, os achados na literatura retratam os efeitos prejudiciais da restrição alimentar gestacional e o uso da Metirapona nessa fase. Contudo, não existem relatos na literatura sobre os efeitos da Metirapona sobre a viabilidade gestacional e a morfologia das uNKs quando utilizada do 1º ao 10º dia de gestação.

3 JUSTIFICATIVA

De acordo com dados da WHO (2012) existem muitas pessoas obesas e mal nutridas por todo o mundo e estes valores, contraditórios vem aumentando de maneira acelerada no Brasil, ilustrando duas realidades distintas: supernutrição e fome. Recentemente, tem sido crescente o número de pesquisas buscando os efeitos de desbalanceamento em dietas antes ou durante a gestação nas mães de animais modelo e até mesmo de suas proles.

Sabe-se que a restrição alimentar materna durante a gravidez é um estímulo estressor que provoca a produção de corticosteroides como já amplamente descrito na literatura.

Apesar do conhecimento encontrado na literatura a respeito dos efeitos da restrição alimentar sobre a prenhez de camundongos ou gestação de humanos, escassos são os dados que expliquem esses efeitos, sobretudo o conhecimento da ação da restrição alimentar sobre as uNK. Nesse sentido, desenvolvemos em nosso laboratório (Salles, 2014) a investigação dos efeitos da restrição alimentar sobre as uNK e constatamos que essas células diminuem de tamanho, tem sua diferenciação e senescência atrasada sem contudo ser observada modificações na expressão da proteína citotóxica perforina. Interessantemente, nesse trabalho a restrição alimentar se revelou um estímulo do tipo tudo ou nada, sendo que 50% dos camundongos submetidos a esse tratamento tiveram perda gestacional, ou seja, não estavam prenhes no 10^o ddg.

Portanto, fruto da fragmentação de conhecimento a respeito dos efeitos da restrição alimentar sobre a gestação e particularmente células uNK e com o intuito de investigar os efeitos do glicocorticoides sobre o útero, células uNK e perda gestacional em animais sob restrição alimentar, propusemos na presente dissertação o uso da Met, um inibidor da síntese de glicocorticoides nesses animais. Com esse estudo pretendíamos investigar se os glicocorticoides secretados pela adrenal seriam os responsáveis pelos efeitos deletérios da restrição alimentar na prenhez de camundongos, animais esses que são amplamente utilizados como animal modelo em biologia da reprodução.

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da Met na viabilidade gestacional, morfologia uterina, sobre as células UNK DBA++, e análise morfométrica do tecido adiposo marrom em camundongos prenhes submetidos ou não submetidos à restrição alimentar do 1º ao 10º ddg.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos da Met no comportamento de camundongos prenhes submetidos ou não submetidos à restrição alimentar nos parâmetros relacionados à ansiedade;
- b) Avaliar o efeito da Met sobre o peso da adrenal de camundongos submetidos ou não submetidos à restrição alimentar durante a gestação;
- c) Avaliar por meio de estudo morfológico e citoquímico os efeitos da Met na viabilidade gestacional, morfologia do útero e na expressão de N-acetil-D-Galactosamina pelas células uNK em camundongos prenhes submetidos ou não submetidos a restrição alimentar.;
- d) Avaliar por métodos estereológicos os efeitos da Met no tamanho dos adipócitos marrons;
- e) Avaliar a viabilidade gestacional no 10º ddg e a termo.

5 MATERIAL E MÉTODO

Nas próximas seções são descritos todos os métodos utilizados para a realização desse trabalho, que foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL/MG (Protocolo 18/2017, Anexo A).

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* oriundos do Biotério da UNIFAL-MG. As fêmeas foram acasaladas com os machos da mesma linhagem em sistema de arem (3 fêmeas para cada macho) e foi considerado o primeiro dia de gestação (1º ddg) o dia no qual se constata a presença do tampão vaginal. As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas com acesso à água e comida *ad libitum* (Ração Controle-RC) ou submetidas á restrição alimentar (RA), em ciclo de 12/12 horas claro e escuro. Todos os procedimentos animais foram submetidos e executados após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG nº 18/2017.

5.2 Organização dos Grupos Experimentais

Todos os animais foram tratados do primeiro ao 10º ddg por gavagem com solução salina 0,3M ou Met, período no qual existe maior incidência de células uNK (PAFFARO JR et al., 2003) e analisados no 10º ddg ou após o parto. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos: Camundongos que receberam ração controle e solução salina 0,3M (RC), que receberam ração controle e Met (Met), que foram submetidos à restrição alimentar (4 gramas de ração controle por dia) e solução salina 0,3M (RA), e que foram submetidos a restrição alimentar e Met (RA+Met)(FIGURA 1). A organização e tamanho das amostras dos diferentes grupos estudos estão demonstrados na figura 2.

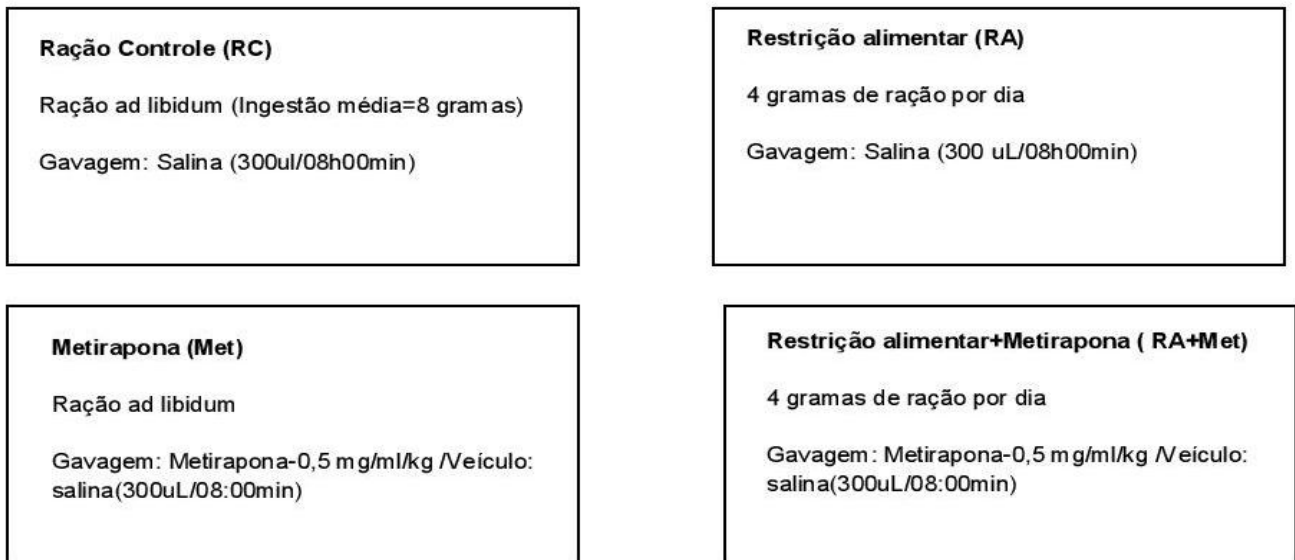


FIGURA 1 - Grupos experimentais e respectivos tratamentos.

(Fonte: da autora)

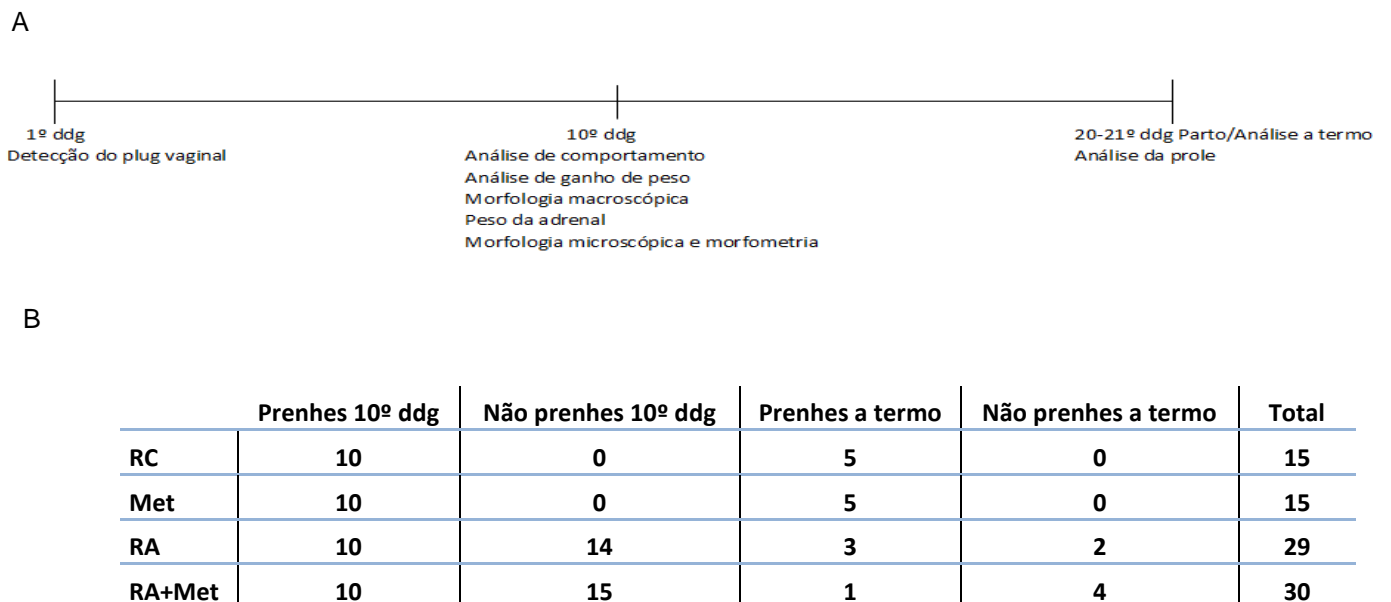


FIGURA 2 - Organização dos grupos experimentais e tamanho das amostras (n).

Experimentos realizados (A). Tamanho da amostra experimental (B). Grupo submetido à ração controle (RC). Grupo submetido à ração Controle e Metirapona (Met). Grupo submetido à Restrição alimentar (RA). Grupo submetido à restrição alimentar e Metirapona (RA+Met).

(Fonte: da autora)

5.3 GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES

Após constatação do tampão vaginal, os camundongos prenhes foram pesados diariamente entre o 1° e 10° dia de gestação a fim de se detectar alterações no ganho de peso.

5.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

Os testes de comportamento foram realizados sempre no 10º ddg, no período da manhã. 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.

O aparato do campo aberto é constituído por um círculo de acrílico de 90 cm de diâmetro, com paredes de 35 cm de altura. O fundo desta arena é marcado por 4 círculos concêntricos, cortados por 2 retas dividindo a arena em 12 quadrantes disformes. O teste foi realizado introduzindo o animal no centro da arena de experimentação, deixando que o mesmo explorasse livremente por um período de 5 minutos. Durante a realização do teste, não houve a presença do pesquisador no recinto, como forma de evitar possíveis situações de estresse para o animal. Antes da realização do teste o animal foi submetido a ambientalização, onde permaneceu no aparato por 20 minutos .

Durante a análise do vídeo, o comportamento do animal foi averiguado, medindo-se a frequência de defecações (número de bolos fecais), número de *reallling* ou *rumping*, ou *seja*, do comportamento de levantar, (movimento no qual o animal apoia-se sobre as patas traseiras tocando as paredes laterais do cilindro de acrílico). Foi analisado também o tempo de exploração dos animais nos quadrantes centrais e periféricos, medindo-se também o número de cruzamentos nos quadrantes periféricos e nos quadrantes centrais. Entre a exposição de um animal e outro foi realizada a limpeza do chão da arena com álcool 10% secando bem e deixando circular um pouco de ar. Foi considerado cruzamento entre quadrantes quando o animal colocou suas 4 patas no mesmo (TOYAMA, 2012).

5.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL E DO PESO DA ADRENAL NO 10º ddg.

A viabilidade gestacional foi analisada por meio da análise macroscópica dos sítios de implantação no 10º ddg. Macroscopicamente os úteros prenhes de camundongos foram avaliados quanto à ocorrência de sítios de implantação os quais foram quantificados. Além disso, as adrenais de todos os grupos estudados foram dissecadas e pesadas.

5.6 PROCESSAMENTO PARA EMBEBIÇÃO EM PARAFINA

Os animais foram perfundidos com paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,05 M pH7, 4 sob anestesia (Isoflurano 2%, 1ml/ml, via inalatória). Os sítios de implantação embrionária de cada animal e tecido adiposo marrom, 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 µm os quais foram montados em lâminas previamente revestidos 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 .

5.7 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:

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

- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- Incubação 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;
- Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:300 por 1 hora;
- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250µL) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H₂O₂ 30 vols. (20 µL);
- Lavagem com água destilada;
- Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos, lavagem em água destilada e diferenciação com solução supersaturada de carbonato de lítio durante 30 segundos;
- 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.

4.8. COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

As lâminas contendo as secções teciduais foram desparafinizadas em xilol (dois banhos de 20 min), desidratadas em bateria de etanol (Absoluto I e II, 95% e 70% - 5 min cada), coradas com Hematoxilina por 45 segundos, lavadas em água corrente e água destilada para a retirada do excesso de corante e coradas com Eosina por 30 segundos. As lâminas foram então desidratadas por uma bateria crescente de etanol: 70%, 90%, 95%, absoluto I, II e III (5 min cada), banhadas em Xilol (2 vezes - 5 minutos) e montadas com bálsamo do Canadá.

5.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo marrom foi analisado ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sighth-Fi1/Nikon/Japan). A área dos adipócitos foi medida com auxílio do programa NIS-Elements (Nikon/Japan), onde foram fotografados cinco campos aleatórios, de um corte de tecido adiposo marrom, de cada animal, no aumento de 40x. Em cada campo fotografado, foram medidos 15 adipócitos aleatoriamente e coletados os valores das suas áreas em micrômetros quadrados (μm^2).

5.9 ANÁLISE DA PREENHEZ A TERMO, TAMANHO E PESO DA PROLE.

Foram analisados cinco animais de cada grupo analisado quanto à prenhez a termo. Neste estudo foi analisada a viabilidade gestacional pela verificação ou não do parto. Além disso, foi contado o número de filhotes, bem como, analisados o tamanho (medida com paquímetro da distancia cefalo-caldal) e peso dos filhotes (prole).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados por meio do software PRISMA 5.01. Para os dados de ganho de peso foi procedido o teste de anova one way e pós-teste de Tukey. Para os testes de viabilidade Gestacional (número de animais prenhes) no 10º dgd e na prenhez a termo foi realizada a análise de contingente seguida do teste do qui-quadrado (χ^2). Para todos os demais dados foi procedido o teste de ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni. O índice de significância adotado no estudo foi sempre $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados obtidos dos grupos RC, RA, Met, Restrição +Met em nosso estudo; com os respectivos gráficos e descrição dos resultados.

6.1 ESTUDO NA DOSE INICIAL DE 7,5 MG/ML/KG DE MET EM SALINA.

Propusemos em nosso trabalho inicialmente a utilização da dose de Met 7,5 mg/ml/Kg administrada por gavagem do 1^o ao 10^o ddg. Assim sendo dois animais de cada um dos quatro grupos: RC, Met, RA e RA + Met foram inicialmente utilizados nesse estudo prévio. Porém notamos que apesar do grupo RC possuir úteros com sítios de implantação de aspecto normal como esperado, todos os animais que receberam Met na concentração de 7,5 mg/ml/Kg do 1^o ao 10^o dia de gestação continham muitos sítios de implantação em avançado estágio de reabsorção e o aborto era muito evidente (imagens não mostradas). Portanto, a dosagem inicial proposta de 7,5 mg/ml/Kg de Met se mostrou inviável em nosso estudo.

6.2 ESTABELECIMENTO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE MET

Fruto de nossos problemas encontrados com o uso de Met na concentração de 7,5 mg/ml/Kg propusemos um teste para determinação da concentração ideal de Met em nossos trabalhos.

Na literatura existe descrição da restrição alimentar concomitante com administração de Met em animais da segunda metade da gestação (a partir do 10^o ddg) até o término da prenhez (BLONDEAU et al., 2001; HUESON, C.M; DEAK, T., 2014; KHORRAM et al., 2013), em vias de administração e dosagens heterogêneas.

Portanto, nossos dados iniciais mostraram que a administração por gavagem de Met na concentração de 7,5 mg/ml/Kg em camundongos gestantes do 1^o ao 10^o ddg era muito alta para tornar viável sua utilização. É importante ressaltar que não existem relatos na literatura de administração diária de Met em camundongos prenhes na primeira metade da gestação (do 1^o ao 10^o dia). No entanto, a primeira metade da gestação de camundongos é um momento onde as células uNK uterinas

proliferam e se diferenciam atingindo seu maior pico no 10^o ddg (PAFFARO JR et al., 2003) o que justifica nosso interesse na realização do estudo nesse período gestacional.

Para transpassar o obstáculo referente à dosagem de Met, realizamos um estudo para determinar a concentração ideal dessa droga a ser administrada oralmente por meio de gavagem na primeira metade da gestação. Para tanto 10 animais foram acasalados com machos da mesma linhagem para obtenção de animais prenhes. Esses camundongos prenhes foram submetidos a doses diárias de Met do 1^o ao 10^o ddg nas concentrações de 0,25 mg/ml/Kg ou 0,5 mg/ml/Kg ou 0,75mg/ml/Kg ou 1,0 mg/ml/Kg ou 1,25 mg/ml/Kg.

Para este estudo foram utilizados dois animais para cada uma das dosagens testadas. Este estudo revelou que a dose de 0,5 mg/ml/Kg foi a dose ideal para nosso estudo, pois por meio dela foi possível obter animais com úteros contendo sítios de implantação que aparentavam morfologicamente viáveis e que poderiam possibilitar nossos estudos posteriores (Figura 3).

Sendo assim, em nossos estudos posteriores todos os grupos receptores de Met foram tratados com a dose de 0,5 mg/ml/Kg.

Portanto, após o estabelecimento da concentração ideal de Met para observação dos sítios de implantação embrionária de camundongos foi iniciada a análise de efeitos da Met na gestação de camundongos sob-restrrição alimentar nos grupos experimentais descritos no item 4.2 e na figura 1.

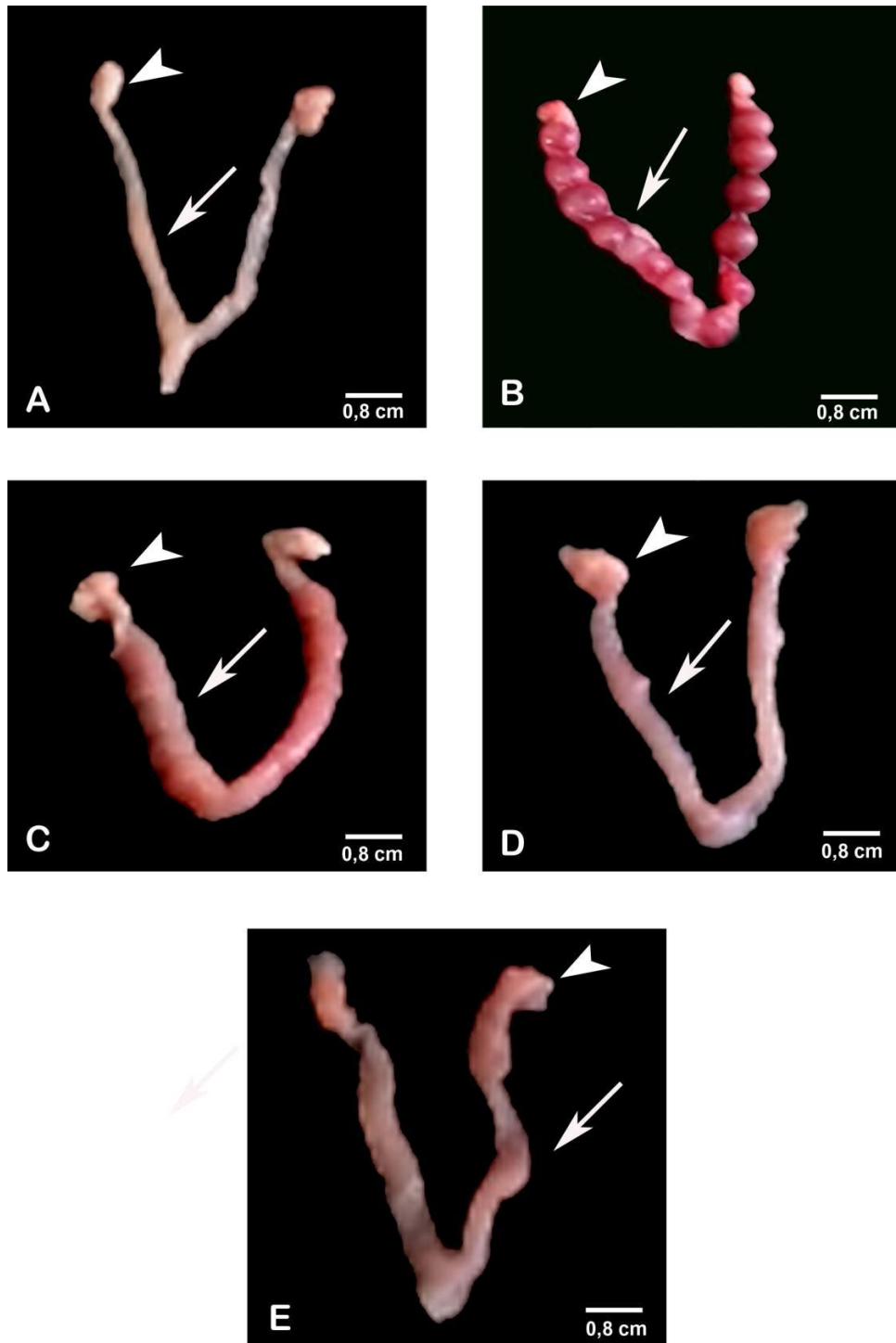
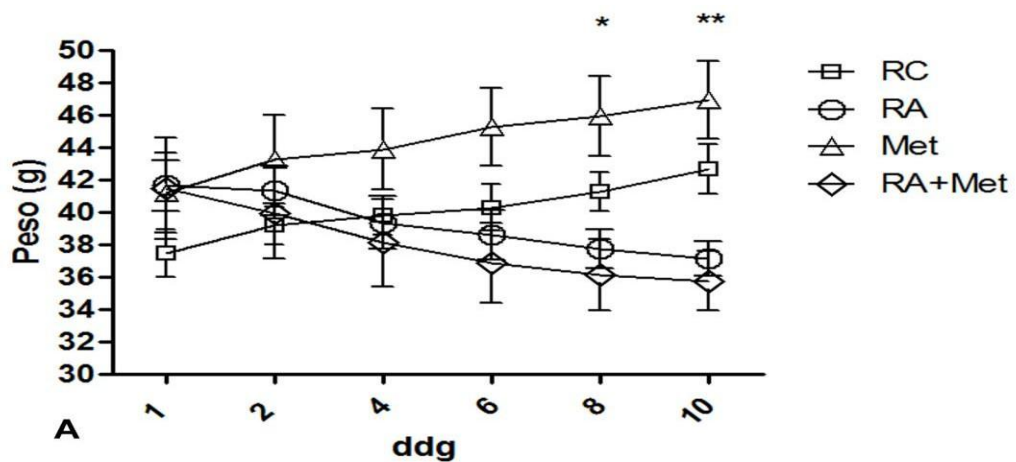


FIGURA 3: Imagens macroscópicas de sítios prenhes no 10º d.d.g. Sítios de implantação (B), sítios em reabsorção (C), úteros com ausência de implantação (A; D e E). Doses de 0,25 mg/ml/Kg (A); 0,5mg/ml/Kg (B); 0,75 mg/ml/Kg(C);1,0 mg/ml/Kg (D) e 1,25 mg/ml/Kg (E). Ovários (cabeça de seta). Sítio de implantação /útero (setas). (Fonte: da autora)

6.3 ANÁLISE DE GANHO DE PESO DOS CAMUNDONGOS PRENHES

Após estabelecida a concentração ideal de Met, todos os camundongos prenhes foram pesados no 1º, 2º, 4º, 6º, 8º e 10º d.d.g para análise do ganho de peso nos grupos estudados. Não foram encontradas diferenças significativas entre o ganho de peso do 1º ao 6º ddg nos animais de todos os grupos. Os animais do grupo RC e Met apresentavam ganho de peso semelhante do 1º ao 10º ddg. No entanto, os animais dos grupos RA e RA+Met tinham menor peso médio no 8º ddg (37,74 g e 36,71, $p=0,01$) e 10º ddg (37,13g e 35,76 g, $p=0,0025$), ou seja, animais RA e RA+met exibiram menor ganho de peso estatisticamente notado a partir do 8º ddg. (Figura 4).



ddg	PESO (g)					
	1º	2º	4º	6º	8º	10º
RC	37,48±3,304	39,18±2,627	39,81±2,729	40,28±3,215	41,26±2,682	40,11±1,773
RA	41,66±3,506	41,36±3,420	39,36±3,712	38,61±3,435	37,74±2,725*	39,31±1,866*
Met	41,21±5,520	43,27±6,171	43,88±5,583	45,26±5,403	45,91±5,527	44,41±2,052
RA+Met	41,46±5,458	39,95±4,885	38,10±4,702	36,86±4,276	36,16±3,826*	38,05±2,256*

B

FIGURA 4- A. Ganho de peso dos animais prenhes do 1º ao 10º ddg. Ração Controle (RC), Restrição Alimentar (RA) Met (Met), RA + Met (RA+Met). (*) refere-se à diferença estatística onde $p < 0,01$. (**) Refere-se à diferença estatística em relação ao grupo RC, onde $p < 0,001$. B. Valores do ganho de peso expressos como média±desvio padrão (Testes não paramétricos).

(Fonte: da autora)

6.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

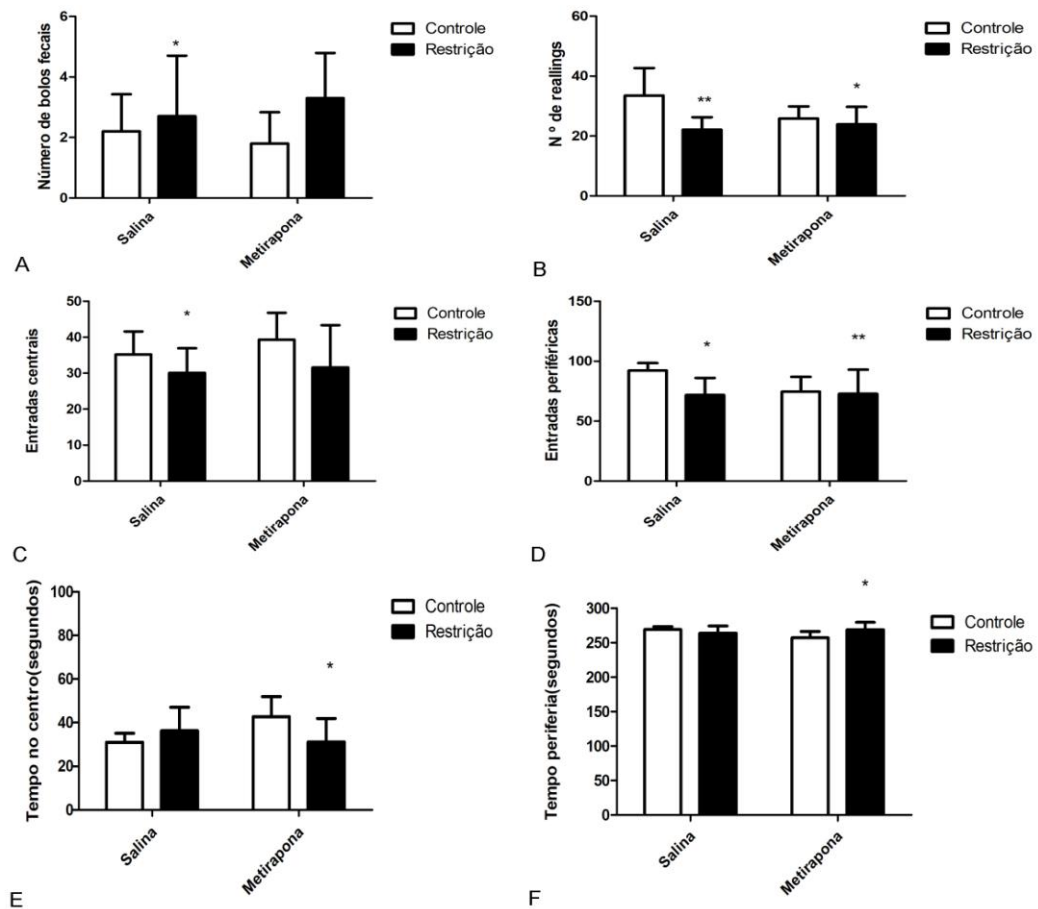
Em nossos estudos etológicos, no teste de campo aberto, foi encontrado um aumento do número de bolos fecais apenas no grupo RA ($p < 0,0401$) em comparação ao grupo RC (Figura 5A).

Foram notadas diminuições no número de *reallings* (Figura 5B) nos grupos Met ($p < 0,0149$), RA ($p < 0,0036$) e RA+Met ($p < 0,0209$) quando comparados ao grupo RC. No entanto, o tratamento com Met não reverteu os efeitos de a restrição alimentar na diminuição de *reallings* já que esse número foi semelhante nos grupos RA (22, 10) e Met+RA (23, 90).

Quanto ao número de entradas centrais no teste do campo aberto (Figura 5C) houve uma redução desses cruzamentos centrais nos animais do grupo RA ($p < 0,0213$). A observação do número de entradas periféricas (Figura 5D) demonstrou uma diminuição no número destas entradas nos grupos RA ($p < 0,0179$) e RA+ Met ($p < 0,048$) quando comparado ao grupo RC.

Foi observada uma diminuição no tempo de permanência no centro (Figura 5E) em animais do grupo RA+Met ($p < 0,058$) demonstrando que o tratamento conjunto de Restrição alimentar e Met diminuiu a permanência dos camundongos no centro do campo aberto em relação ao grupo RC.

Uma diminuição significativa foi também notada no tempo de permanência na periferia (Figura 5F) em animais do grupo Ra+Met ($p < 0,055$) quando comparado ao grupo RC, novamente demonstrando o efeito conjunto dos tratamentos restrição alimentar e Met.



Parâmetros	Valores de F		
	Restrição	Metirapona	Interação
Bolos Fecais	$F_{1,36} = 7,64, p < 0,01^*$	$F_{1,36} = 0,53, p < 0,4731$	$F_{1,36} = 6,11, p < 0,0198^*$
Entradas Centrais	$F_{1,36} = 1,11, p < 0,2991$	$F_{1,36} = 5,8, p < 0,0213^*$	$F_{1,36} = 0,24, p < 0,6227$
Entradas Periféricas	$F_{1,36} = 3,44, p < 0,0718$	$F_{1,36} = 6,15, p < 0,0179^*$	$F_{1,36} = 4,36, p < 0,048$
Número de reallings	$F_{1,36} = 11,85, p < 0,015^*$	$F_{1,36} = 2,22, p < 0,0015$	$F_{1,36} = 5,83, p < 0,0209^*$
Tempo no centro	$F_{1,36} = 1,21, p < 0,2781$	$F_{1,36} = 1,54, p < 0,2226$	$F_{1,36} = 8,73, p < 0,055^*$
Tempo periferia	$F_{1,36} = 1,19, p < 0,2818$	$F_{1,36} = 1,35, p < 0,2529$	$F_{1,36} = 8,59, p < 0,058^*$

G

FIGURA 5- A-F. Estudo Comportamental no teste de campo aberto.

* e ** referem-se às diferenças estatísticas quando dados foram comparados ao controle (A-F). Análise da variância do teste de campo aberto. (ANOVA twoway, seguido de pós-teste de Bonferroni.

(Fonte: da autora)

6.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL E DO PESO DA ADRENAL NO 10º ddg.

No 10º ddg, os animais submetidos á eutanásia foram analisados quanto à presença de sítios de implantação embrionária para diagnóstico da prenhez. Todos os cinco animais dos grupos RC (Figura 6A e 6F-6J) e Met (Figura 6A e 6K-6O) apresentavam sítios de implantação embrionária de aspecto macroscópico normal. No entanto, a viabilidade gestacional foi bastante comprometida nos grupos RA e RA+Met ao ponto de serem necessários 22 animais para obtenção de 5 animais apresentando sítios de implantação embrionária no grupo RA (Figura 6A e 6P-6T). Além disso, foram necessários 25 animais do grupo RA+Met para obtenção de apenas 3 animais com sítios de implantação embrionária nesse grupo (Figura 6U-6Y). Destes três animais do grupo RA+Met contendo sítios de implantação, um deles apresentava sítios de implantação pequenos e em reabsorção (Figura 6v).

Como fito da investigação dos efeitos da restrição alimentar e/ou Met sob o peso da adrenal, no décimo dia de gestação, foi procedida também a coleta e pesagem das adrenais de animais contendo sítios de implantação (Figura 6B e 6D). As adrenais dos camundongos do grupo RA tinham peso (0,02776g, $\pm 0,006$) similar ao do grupo RC (0,02173, $\pm 0,007$ g). No entanto, a estatística revelou que as adrenais do grupo Met pesavam mais (0,0287 \pm 0,06) que o grupo RC ($p < 0,0269$). No que diz respeito às adrenais do grupo RA+Met, estas tinham peso (0,01302 \pm 0,0125) estatisticamente menor ($p < 0,05$) que o grupo RC mostrando o efeito mais contundente da soma dos dois tratamentos, restrição alimentar e Met, em nossos estudos.

Nos animais que apresentavam sítios de implantação no 10º ddg, esses sítios foram contados (Figura 6C e 6E), sendo observados em média 14,2 sítios no grupo RC, 14 sítios no grupo RA, 14,6 sítios no grupo Met e 15,33 sítios no grupo RA+Met, ou seja, não foram observadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) no número de sítios de implantação entre os animais prenhes de todos os grupos.

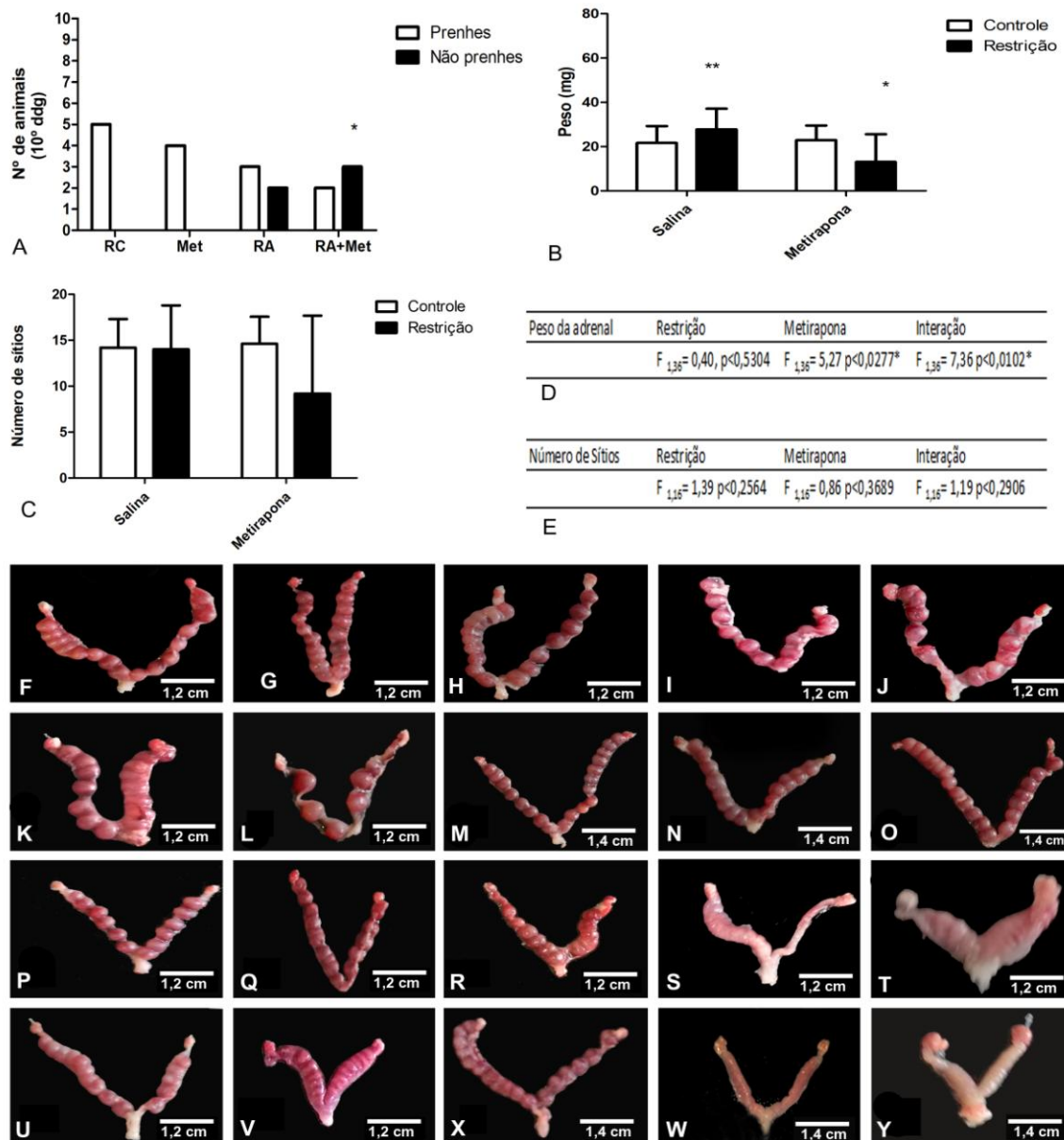


FIGURA 6- Viabilidade gestacional (A) e peso da adrenal (B). Número de sítios de implantação (C). Imagens macroscópicas de úteros no 10^o ddg de animais do grupo RC. (F-J). Imagens macroscópicas de úteros no 10^o ddg de animais do grupo Met. (K-O). Imagens macroscópicas de úteros no 10^o ddg de animais do grupo RA. (P-T). Imagens macroscópicas de úteros no 10^o ddg de animais do grupo RA+Met (U-Y). Análise de variância ANOVA two-way, seguido de pós teste de *Bonferroni* das amostras referentes ao peso da adrenal. Análise de variância ANOVA two-way, seguido de pós teste de *Bonferroni* das amostras referentes ao número de sítios de implantação. (Fonte: da autora)

6.5.1 Análise morfológica e citoquímica

Os sítios de implantação embrionária do 10º ddg de animais de todos os grupos foram processados para embebição em parafina e submetidos á citoquímica de Lectina DBA e coloração de HE. Por meio da citoquímica foi possível observar as células uNK reativas para lectina DBA (DBA⁺uNK) espalhadas pela região mesometrial dos sítios de implantação embrionária de animais de todos os grupos analisados em nosso estudo (Figuras 7A–7D). À microscopia de luz em aumentos panorâmicos, os sítios de implantação de animais do grupo RC continham uNK que eram fortemente reativas para lectina DBA (Figura 7A). No entanto, nos animais do grupo Met a reação para lectina DBA parecia mais fraca (Figura 7B) quando comparado ao grupo RC. A reação positiva para Lectina DBA nas uNK parecia mais forte nos grupos RA (Figura 7c) e RA-Met (Figura 7D) quando comparadas com a observada nos sítios de implantação do grupo Met.

Nos cortes histológicos dos sítios de implantação de animais do grupo RC em microscopia de luz de maior aumento foi possível observar claramente a reação positiva para lectina DBA nos grânulos e delineando a superfície das células uNK, sendo encontradas muitas células com grânulos citoplasmáticos DBA reativos, núcleo onde predominava a eucromatina e nucléolo evidente (Figura 7E).

Interessantemente, nos cortes histológicos de sítios de implantação dos animais grupo Met submetidos á microscopia de luz de maior detalhe, as células uNK continham grânulos de aspecto vazio e claramente menos reativos á Lectina DBA em células uNK onde as superfícies exibiam ausência ou irregularidade de reação para lectina DBA (Figura 7F).

No entanto, nos cortes histológicos de sítios de implantação de animais do grupo RA, as células uNK apesar de fortemente reativas para lectina DBA pareciam menores e com poucos grânulos citoplasmáticos (Figura 7G).

Aspecto semelhante à esse das uNK DBA⁺ pode ser observado em sítios de implantação embrionária de animais do grupo RA+Met (Figura 7H). Nos cortes histológicos de sítios de implantação de animais do grupo RC submetidos á coloração de HE foram observadas células semelhantes às uNK DBA⁺ que apresentavam núcleo onde predominava a eucromatina, nucléolo evidente e grânulos acidófilos, ou seja, corados pela eosina (Figura 7I). Nos cortes de sítios de implantação de animais do grupo Met submetidos ao HE, células semelhantes às

uNKs tinham citoplasma de aspecto extraído e os grânulos acidófilos eram raros ou ausentes (Figura 7J). Nos cortes histológicos de sítios de implantação corados com HE dos grupos RA (Figura 7K) e RA+MET (Figura 7L), as células semelhantes às uNK pareciam menores que as do grupo RC e Met, mas continham grânulos acidófilos em seu citoplasma (Figura 8B).

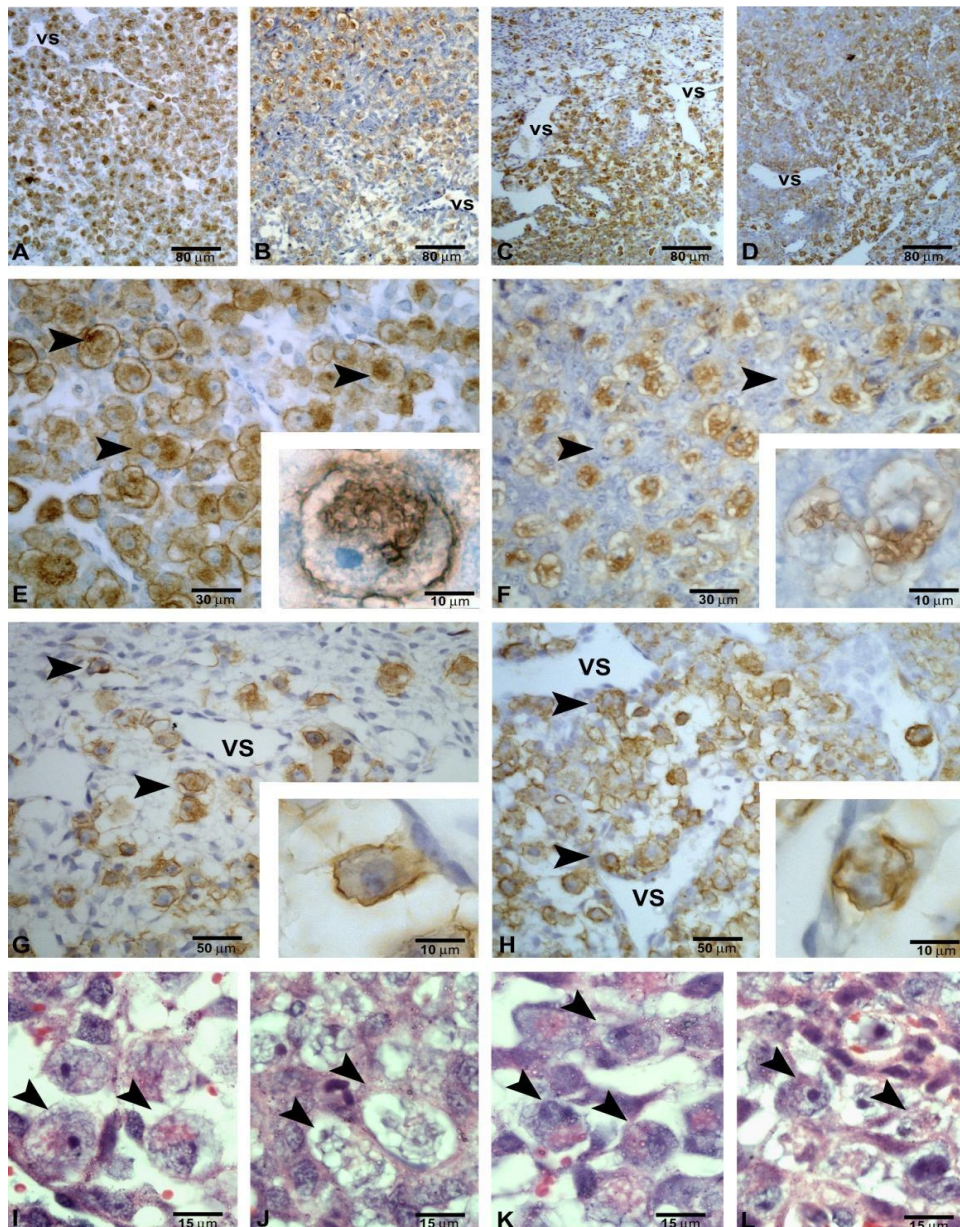


FIGURA 7- Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação submetidos a Citoquímica com lectina DBA. Sítio de implantação do grupo RC reativo a lectina DBA (A) Met(B), RA (C), RA+Met(D); fotomicrografia de célula natural killer uterine no grupo controle(E), no grupo Meirapona(F), no grupo Restrição alimentar(G) e no grupo Restrição+Metirapona (H).Sítio de implantação controle submetido a HE(I),Metirapona(J),Restrição(K), Restrição+Metirapona(L). Célula natural killer uterina (Cabeça de seta). Vasos Sanguíneos(VS). (Fonte: da autora)

6.6 MORFOMETRIA TECIDO ADIPOSEO MARROM

Após processamento e coloração de rotina foi possível a análise morfológica e morfométrica do tecido adiposo marrom. Os tecidos de ambos os grupos apresentavam células poligonais com núcleos esféricos, e citoplasma preenchido por gotículas lipídicas. Apenas no grupo RA (FIGURA 8D) foi observada uma redução significativa na área ($p < 0,024$) em relação ao grupo RC (FIGURA 8B).

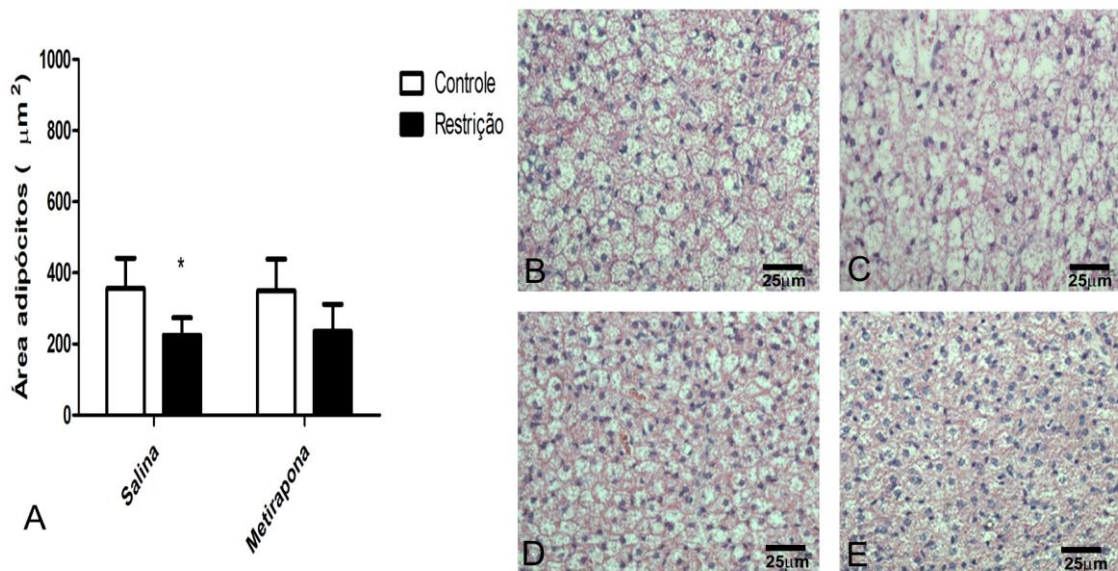


FIGURA 8: Análise morfométrica do tecido adiposo marrom. Gráfico da área dos adipócitos (A). Fotomicrografias de cortes histológico de tecido adiposo marrom (40X) submetido a HE: RC (B); Met(C); RA (D); RA+Met (E). (Fonte: da autora)

6.7 ANÁLISES DA PREENHEZ A TERMO, TAMANHO E PESO DA PROLE.

Para avaliação da prenhez á termo, camundongos prenhes de todos os grupos analisados foram mantidos até o término da gestação. Nestes animais foi primeiramente realizada a observação do parto (prenhes) ou não ocorrência do parto (não prenhes) (figura 8A). Em todos os animais do grupo RC foi observado o parto. Nos 5 animais do grupo Met utilizados nesse estudo foi também verificado o parto. No entanto, dos 5 animais do grupo RA utilizados em apenas 3 (60%)foi observado o parto, enquanto 2 não estavam prenhes no término do período gestacional analisado e possuíam úteros de aspecto virgem (figura 8B). O Parto ocorreu em apenas 1 (20%)animal do grupo RA+Met e nos 4 animais restantes o parto não ocorreu e seus úteros tinham também o aspecto de úteros virgens (Figura 8C).

Foi procedida a contagem dos filhotes dos animais de todos os grupos após o parto. Os animais do grupo RC tiveram em média 11 filhotes, enquanto os animais do grupo Met tiveram 12,67, os do grupo RA tiveram 9,5 e os do grupo RA+Met tiveram 12 filhotes (Figura 8D). Não foram encontradas diferenças significativas entre o número de filhotes quando comparados os diferentes grupos (Figura 8G).

Os filhotes de todos os grupos utilizados também foram pesados (figura 8E). Os filhotes dos animais do grupo controle tinham em média 1,89 g. Os filhotes dos animais do grupo Met tinham o peso médio de 1,94, enquanto os do grupo RA tinham 2,2g e os do grupo RA+Met tinham 1,8g. Também não foram identificadas diferenças significativas entre os pesos dos filhotes em nosso estudo (Figura 8H).

Quanto ao tamanho dos filhotes dos diferentes grupos analisados também não foram encontradas diferenças significativa da distancia céfalo-caudal entre todos os grupos analisados (Figura 8F e 8I)

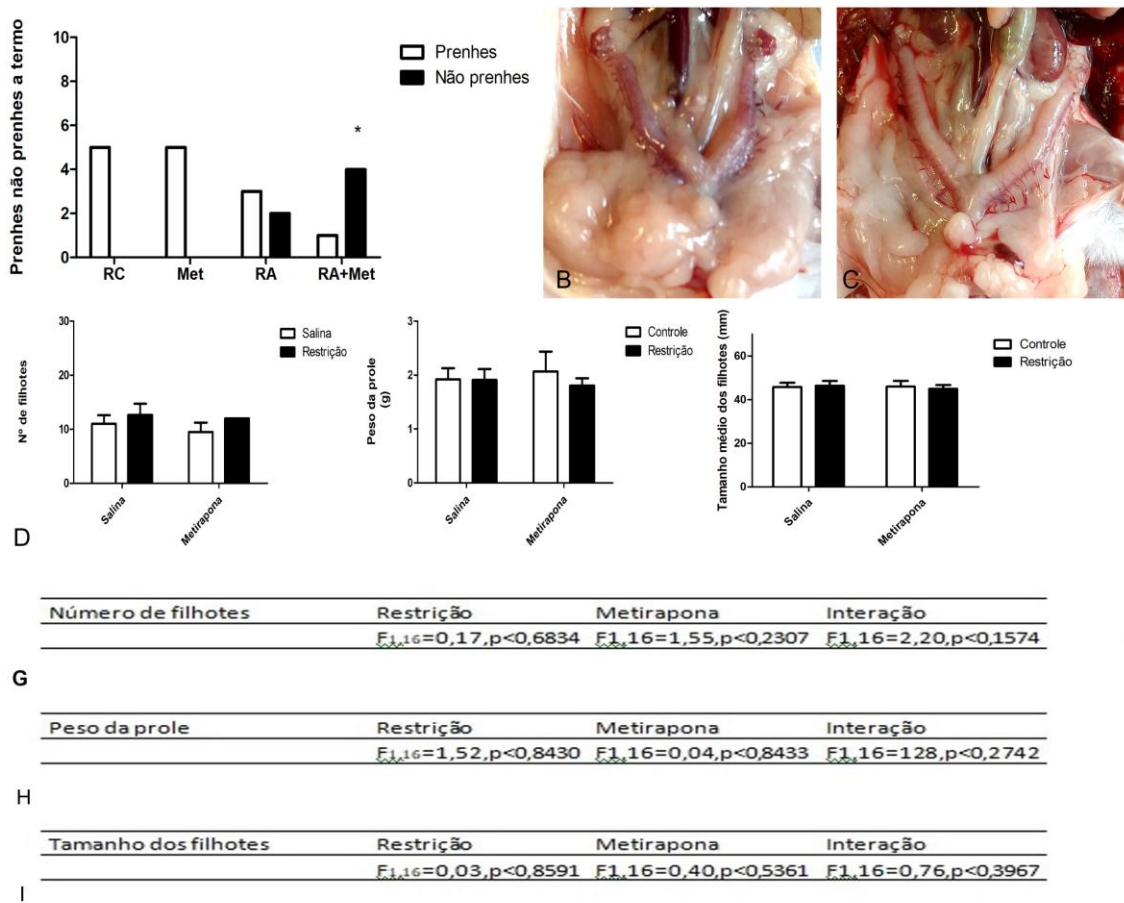


FIGURA 9 -A. Gráfico do número de animais prenhes e não prenhes diagnosticado à termo. B e C. Imagens macroscópicas do útero de aspecto virgem de animais do grupo RA (B) e RA+Met (C) à termo. D. número médio de filhotes. E. Peso da Prole. F. Tamanho dos Filhotes. G, H e I. Análise estatística respectivamente do número, peso e tamanho dos filhotes (ANOVA twoway, seguida de pós teste de Bonferroni). (Fonte: da autora)

7 DISCUSSÃO

Com base em estudos na qual a Met foi administrada em animais da metade ao final da prenhez BLONDEAU et al.,(2001); HUESON, C.M; DEAK, T., (2014); KHORRAM et al.,(2013), propusemos a concentração de 7,5 mg/ml/Kg de Met em Salina 0,3 M para execução de nosso estudo. Inicialmente, portanto, a Met foi administrada nessa concentração pela via oral por meio de gavagem do 1º ao 10º de gestação de camundongos.

Pra nossa surpresa, nessa concentração inicial a Met provocou perda fetal, sendo observados sítios de implantação embrionária em estágio avançado de reabsorção tornando o aborto bastante evidente. Constatamos dessa maneira, nesse estudo prévio que a Met na concentração de 7,5mg/ml/Kg tem efeito abortivo inviabilizando os estudos posteriores. Não existem relatos na literatura do efeito abortivo de Met em qualquer concentração. Portanto, esse é o primeiro relato de que a administração na prenhez inicial (do 1º ao 10º dgd) desse inibidor da síntese de glicocorticoide na concentração de 7,5 mg/ml/kg de animal tem efeito extremamente prejudicial à gestação.

Esse achado evidenciando o efeito abortivo da Met na concentração de 7,5mg/ml/Kg fez-nos realizar novo estudo em busca da concentração ideal de met a ser administrada na fase inicial da gestação de camundongos. Nesses testes para obtenção da concentração ideal de Met, foi notado que as concentrações de 1,25mg; 1,0mg; 0,75mg e 0,25mg/ml/Kg também provocaram aborto. No entanto, com a dosagem de 0,5mg/ml/Kg foram observados sítios de implantação de aspecto normal no 10º dgd evidenciando a viabilidade da gestação o que nos fez adotar essa dosagem em nossos estudos posteriores.

Parnham (1976) demonstrou em estudo clássico que a Met estimula tanto a produção de Prostaglandina E (PGE) quanto à produção de Prostaglandina F (PGF), enquanto que em doses elevadas há estímulo somente para a produção e liberação de PGE e a PGF fica inibida. O autor acrescentou que o estímulo à produção de PGE e PGF em baixas doses de Met se deve a inibição do metabolismo de prostaglandinas. Além disso, o mesmo autor revelou o efeito inibitório direto causado pela administração da Met no músculo circular do útero de ratas prenhes, de forma dose-dependente, inibindo a contração muscular uterina em baixas doses ao mesmo

tempo em que estimulou a produção de prostaglandinas. No nosso estudo, verificamos também a forma dose-dependente de ação da Met, pois em altas doses de Met foi capaz de causar 100% de aborto, enquanto que a dose baixa de 0,5mg/ml/Kg do 1º ao 10º ddg não comprometeu a gestação possibilitando viabilidade de 100% até mesmo no parto.

A partir do estabelecimento da dosagem viável de Met, ou seja, 0,5mg/ml/Kg, passamos a realizar as demais análises planejadas em nosso estudo.

Inicialmente, analisamos o ganho de peso dos camundongos prenhes 1º ao 10º ddg de todos os grupos planejados em nosso estudo, ou seja, animais que receberam Ração Controle (RC), Ração controle + Met (Met), Restrição alimentar (RA) e RA + Met(RA+Met).

Como esperado, os animais dos grupos submetidos à restrição alimentar (RA e RA+Met) tiveram ganho de peso estatisticamente menor quando comparado a animais não submetidos a restrição alimentar. Esses dados concordam com os dados de Salles (2014) que demonstraram a perda de peso em camundongos prenhes submetidos a restrição alimentar do 1º ao 10º ddg. Ferrari e colaboradores (1992) demonstraram também a perda de peso em ratas prenhes submetidas à restrição alimentar de 50%.

Visando verificar a possibilidade do tratamento por Met impedir os efeitos deletérios da síntese de corticoides em situação de estresse provocado pela restrição alimentar todos os grupos estudados foram submetidos à análise etológica no aparato de campo aberto.

Durante esse teste foi procedida a contagem de bolos fecais nos diferentes grupos e nesse parâmetro analisado houve um aumento no número de bolos fecais no grupo RA. A defecação pode estar relacionada com índices de estado emocional (HALL, 1934). Alguns autores encontram correlação negativa existente entre a atividade locomotora e a defecação (STÖHR et al., 1998). Hall (1934), em estudo clássico, afirmou que uma diminuição no índice de defecações com concomitante elevação da atividade locomotora seria indicativa de uma alta reação de emocionalidade.

Quanto ao número de *reallings* ou *rumpings* no campo aberto foi observado diminuição significativa nesse parâmetro comportamental em todos os grupos quando comparados ao RC. No entanto a Met não foi capaz de impedir esse aumento de *reallings*, ou seja, não pode impedir os efeitos da restrição alimentar

nesse parâmetro.

O ato de empinar o corpo colocando as patas dianteiras nas paredes laterais do labirinto, levantando a cabeça e se apoiando sob as duas patas dianteiras é denominado *rumping* ou *realling*. Essa é uma medida importante a ser observada nos testes etológicos, pois indicam aumento da atividade de ansiedade nos animais (BARBALHO, 2007; GIANLORENÇO, 2009; LACERDA, 2006; MAGALHÃES, 2011; SERAFIM, 2008). No entanto, outros autores relatam que a diminuição do número de rearing pode estar associada a diminuição locomotora do animal (COLE; RODGERS, 1993; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994). Não obstante, o *realling* é mais usado para mensurar a atividade de locomoção vertical e pode-se observar também que sua frequência tende a aumentar nos braços fechados em outro teste comportamental denominado labirinto em cruz elevado (MARTINEZ et al., 2002). Portanto, nossos estudos indicam que tanto a restrição alimentar quanto a Met tiveram efeito ansiogênico nos camundongos prenhes diminuindo concomitantemente sua atividade locomotora.

Os roedores submetidos ao teste do campo aberto tendem a preferir a exploração e a permanência nos quadrantes periféricos em detrimento do quadrante central (CAROLA et al., 2002; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003; RAMOS et al., 1997). Dessa forma, um tempo de permanência maior no quadrante periférico e uma menor permanência no quadrante central pode estar relacionado a um aumento da ansiedade neste teste (CHOLERIS et al., 2001). Em contrapartida, um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade (LISTER, 1990; CHOLERIS et al., 2001). Em nossos estudos encontramos diminuição da permanência no centro no grupo RA+Met e maior tempo de permanência na periferia no mesmo grupo. Além disso, nos grupos RA e Met foi notada uma diminuição nas entradas periféricas.

Portanto, nosso estudo comportamental em conjunto sugere que tanto Met quanto a restrição alimentar são capazes de induzir comportamento do tipo ansiedade em animais prenhes, diminuindo concomitantemente a atividade locomotora. Contudo, Met não foi capaz de impedir os efeitos da restrição alimentar no comportamento destes animais.

Cinco animais de cada um dos grupos analisados foram, no 10^o dia de gestação, submetidos à eutanásia para estudo da viabilidade gestacional e verificação do peso das adrenais. Nos grupos RC e Met foram observadas 100% de

viabilidade gestacional sendo que todos os úteros destes animais possuíam sítios de implantação. No entanto, grande foi a dificuldade de obtenção de sítios de implantação de aspecto viável em animais dos grupos RA e RA+Met. Sendo assim, foram necessários 22 animais do grupo RA e 25 animais do grupo RA+Met para obtenção respectivamente de 5 animais e 3 animais prenhes nesses grupos. Portanto, em nosso estudo a viabilidade gestacional dos grupos RA e RA+Met foi estatisticamente menor no 10^o ddg. Paralelamente, no grupo Met foi notada um discreto aumento do peso médio das adrenais e uma diminuição significativa nesse peso foi observada no grupo RA+Met. Interessantemente os animais quando prenhes mesmo pertencentes ao grupo RA e RA+Met tinham sítios de implantação em número normais.

Nossos estudos da viabilidade gestacional no 10^o ddg concordam com os achados de Ferrari et al., (1992), os quais mostraram que a restrição proteica em ratas adultas pode levar a redução de ninhadas, sendo observado aumento nas taxas de natimortos e de mortalidade perinatal. Os mesmos autores comentaram ainda que a restrição alimentar pode provocar um quadro de estresse mais intenso que a restrição proteica. Estudo recente em nosso laboratório Salles(2014) também demonstrou uma queda na viabilidade gestacional de animais submetidos a restrição alimentar na mesma proporção realizada em nosso estudo. Salles (2014) sugeriu que é razoável supor que a restrição alimentar possa impedir a implantação ou provocar a morte embrionária, o que tornou inviável a gestação de cerca de 50% das fêmeas do grupo RA deste estudo. Nesse sentido, observamos uma perda ainda maior da gestação no grupo RA em nossos estudos, ou seja, da ordem de 73%. Quando os animais submetidos à restrição alimentar foram tratados com Met, grupo RA+Met, a perda gestacional foi semelhante ao grupo restrição alimentar, ou seja, 75%.

Berg (1965) obteve resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo nos grupos RA e RA+Met. Esse autor realizou a restrição alimentar em ratas gestantes nas proporções de 25%, 50% e 70% e observaram que alguns animais tiveram uma gestação bem sucedida e com ninhadas de tamanho normal, enquanto outras não apresentavam sítios de implantação, ou seja, não estavam prenhes. Adicionalmente, Pascalon e Bertrand (1987), realizando a restrição alimentar de 70%, 50% e 25% em ratas prenhes, 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 de Salles (2014), bem como, com nossos dados.

Em nosso trabalho, podemos afirmar que, ao contrário do que proposto na concepção de nosso estudo, a Met não foi capaz de impedir os efeitos da RA na perda gestacional de camundongos até o 10º ddg. No entanto, tanto os camundongos do grupo RA quanto os do grupo RA+Met, quando diagnosticados prenhes, apresentavam sítios de implantação em quantidades semelhantes aos do controle. Nossos dados reforçam, portanto que a restrição alimentar é capaz de provocar um tipo de resposta “tudo ou nada “ na gestação de camundongos que não pode ser impedida pela administração do inibidor de glicocorticoide, metirapona, nas fases iniciais da gestação destes animais.

Como descrito anteriormente, os cortes histológicos dos sítios de implantação embrionária de camundongos no 10ºddg foram submetidos à citoquímica de lectina DBA que é capaz de seletivamente identificar quatro subtipos lectina DBA reativos no útero de camundongos prenhes. Além disso, esses sítios de implantação foram também corados rotineiramente com hematoxilina e Eosina.

Em todos os cortes de sítios de implantação provenientes dos grupos estudados foi possível observar várias células uNKDBA⁺, no entanto, pra nossa surpresa, a reatividade para essa lectina era mais fraca em sítios de implantação de camundongos do grupo Met.

Paffaro et al., (2003) caracterizaram 4 subtipos de célula uNK DBA reativos. O Subtipo I de uNK exibia reatividade para lectina DBA em sua superfície, era pequeno, possuía núcleo onde predominava a heterocromatina e não possuía grânulos em seu citoplasma. O segundo subtipo de uNK (Subtipo II) apresentava superfície positiva para lectina DBA, era um pouco maior e tinha poucos grânulos citoplasmáticos DBA reativos. O Subtipo III exibia superfície fortemente reativa para lectina DBA, era grande, com núcleo onde predominava a eucromatina e nucléolo evidente e com muitos grânulos DBA positivos em seu citoplasma, O subtipo IV era também grande mas possuía descontinuidade de marcação para lectina DBA em sua superfície, grânulos DAB reativos, núcleo e citoplasma de aspecto extraído sugestivos da senescência desse tipo celular.

Em nossos estudos todos esses subtipos caracterizados por Paffaro et al., (2003) foram observados em cortes histológicos de sítios de implantação de animais

RC. Esses animais exibiam, por exemplo, muitas uNK DBA⁺ com núcleo onde predominava a eucromatina, nucléolo evidente e com forte marcação de delinea a sua superfície e evidenciava seus muitos grânulos, características observadas no subtipo III de uNK.

Pra nossa surpresa a observação detalhada dos cortes histológicos dos sítios de implantação de animais do grupo Met revelou que muitas uNK nesses animais tinham uma menor reatividade para lectina DBA, sendo que, nessas esta ausente ou descontinua a marcação em sua superfície e vários grânulos eram menos reativos para essa lectina, tendo uma aspecto de vazios.

Zavan et al., (2016) recentemente sugeriram que a infecção mimetizada pelo lipopolissacarídeo de e-coli (LPS) é capaz de ativar as células uNK alterando seu padrão de reatividade para a lectina DBA originando um novo tipo celular denominado DBA^{low}uNK. Tais DBA^{low}uNK exibiam ausência ou descontinuidade na reatividade para lectina em suas superfícies e tinham grânulos com marcação fraca e de aspecto vazio. Nesse estudo, os autores demonstraram que após 2 horas da injeção de LPS no 10^o ddg, grande era o número dessas DBA^{low}uNK e essas alterações eram concomitantes à perda de reatividade para o anticorpo anti-perforina o que sugeriu a ativação da citotoxicidade destas células. No entanto, o conjunto dos achados destes autores lhes permitiu sugerir que a resposta citotóxica pelas uNK ao LPS seria importante para manutenção da homeostasia uterina e viabilidade gestacional, já que a administração de nimesulide, um inibidor da inflamação via COX-2, impediu as modificações nas uNK causadas pelo LPS causando 100% de perda fetal.

Demonstrando a grande responsividade das uNK quando camundongos prenhes são submetidos à estímulos inflamatórios, além dos estudos utilizando LPS, Salles (2014) demonstrou que tanto o tratamento crônico as rações hiperlipídica quanto hipercalórica foi capaz de causar o surgimento e acúmulo de células DBA^{low}uNK.

Os animais do grupo Met de nosso estudo apresentaram, portanto, células de aspecto semelhante às DBA^{low}uNK encontradas nos estudos de Zavan et al., (2016) e Salles (2014), o que sugere que a metirapona tenha ativado as células uNK a exemplo do que foi por esses autores em seus estudos.

A Met é um inibidor da síntese de glicocorticóides que atua inibindo a 11b-

hidroxilação da desoxicorticosterona (DOC) em corticosterona no córtex da glândula adrenal (JENKINS et al., 1958). No entanto, a literatura traz relatos sobre o efeito paradoxal da metirapona. Rotllant & Armario (2005), por exemplo, relataram que uma única dose de Met (200mg/ml) em ratos machos causou uma desregulação do eixo HPA, apresentando características típicas de um estímulo estressor. Drouet et al., (2011) também demonstrou que a metirapona pode desencadear marcadores biológicos de estresse, mas também pode ter efeito na redução da ansiedade provocada pelo estresse. Por outro lado, em ratas prenhes Khorram et al., (2015) descreveram que a Met administrada do 10^o d.d.g até a gestação a termo é capaz de reverter os efeitos da desnutrição materna sobre a remodelação da artéria carótida da prole destes animais.

Portanto, em nosso estudo, é razoável supor que a administração de metirapona tenha provocado uma desregulação do eixo HPA, fenômeno este que pode ter provocado alterações na gestação a ponto de ativar a resposta das uNK DBA⁺ com o fito de regulação da homeostase uterina e manutenção da prenhez. De fato as uNK DBA⁺ são conhecidas pela sua ação angiogênica Chen et al.,(2012) e na manutenção da decídua e da nutrição do embrião (Erlebacher, 2013). Apesar destas células possuírem muitos grânulos citotóxicos, as uNK de camundongos não exibem citotoxicidade *in vitro*, pois não conseguem lisar as células de mielona YAC-1 em cultura STEWART e PELL(1993), além de que não existem também evidências *in vivo* da degranulação destas células que indiquem sua atividade citotóxica (ASHKAR e CROY, 2001;CROY e KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997).

Quanto a análise microscópica dos sítios de implantação de animais dos grupos RA e RA+Met, em nosso estudo, foi observada que a maioria das células uNK DBA⁺ pareciam menores e continham poucos grânulos citoplasmáticos. Esse resultado obtido nos grupos submetidos à restrição alimentar concorda com os de Salles (2014), no qual revelaram que a restrição alimentar do 1^o ao 10^o ddg causou redução significativa no tamanho das uNK, bem como, em seus grânulos). Salles (2014), em seu estudo prospectivo sugeriu que a restrição alimentar é capaz de prejudicar a diferenciação das uNK aumentando o número de subtipos menos diferenciados (subtipo I e II) diminuindo os subtipos mais diferenciados (Subtipo III eIV) de células uNK.

Sabe-se que animais transgênicos deficientes em uNK (TGE26) (Guimond et

al., 1996) apresentam diminuição na viabilidade gestacional na ordem de cerca de 60%. No entanto, mesmo nesses animais pode ocorrer o parto, ou seja, as uNK são importantes na gestação, no entanto, sua falta não é capaz de permitir 100% de aborto. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a carência nutricional em períodos iniciais de gestação pode prejudicar a diferenciação das células uNK impedindo até mesmo sua resposta ao tratamento com metirapona o que justifica a grande perda gestacional diagnosticada no 10º ddg nos grupos RA e RA+Met de nosso estudo.

Com o fito de verificar a viabilidade gestacional na prenhez á termo, animais de todos os grupos foram mantidos até o parto para comparação dos testes de viabilidade realizados no 10º ddg. Os dados obtidos quanto a viabilidade gestacional á termo são bastante parecidos com aqueles no estudo na metade da gestação. Todos os animais do grupo RC e do grupo Met chegaram ao parto. No entanto dos 5 animais do grupo RA e dos 5 do grupo RA+Met, respectivamente apenas 3 e 1 animal chegaram ao parto. Portanto, em cerca de 60% dos camundongos do grupo RA e 80% do grupo RA+Met não foi observado o parto. A exemplo do observado nos teste de viabilidade gestacional do 10º ddg, todos os camundongos que pariram tiveram proles de número e peso semelhantes e o tratamento com Met não foi capaz de reverter a diminuição da viabilidade gestacional. Portanto os estudos a termo confirmam que a restrição alimentar é capaz de diminuir a viabilidade gestacional causando um tipo de resposta —tudo ou nada nos animais como já caracterizado por outros autores (Berg, 1965; Pascalon e Bertrand, 1987; Salles, 2014). Interessantemente, em animais submetidos a apenas (Met) não foi diminuída a viabilidade gestacional, apesar da observação das DBA^{low} uNK no 10º ddg deste grupo. As viabilidades de 100% da gestação verificadas no 10º ddg e no parto nos animais do grupo Met corroboram para a hipótese de que as células uNK são responsivas ao tratamento por metirapona e parecem ser ativadas para restaurar a homeostasia uterina mantendo a gestação, a exemplo do que foi proposto por Salles (2014) e Zavan et al., (2016) que estudaram a resposta das uNK frente a estímulos inflamatórios como dietas ou LPS.

A gestação requer uma série de mecanismo de adaptação materna sendo necessária a modulação e ativação dos circuitos neuroendócrinos que compreendem o cérebro materno e placenta (PETRAGLIA. F; VOLTOLINI, C 2014). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, componente do circuito neuroendócrino,

desempenha um papel chave na resposta neuroendócrina ao estresse via secreção de cortisol, atuando para restaurar a homeostase (BRUNTON & RUSSEL 2010), sendo que no início da gestação o mecanismo de resposta desse eixo está atenuado (BRUNTON et. al., 2005; BRUNTON et al., 2008; HERRERA, 2000; WELBERG E SECKL, 2001).

O tecido adiposo marrom, responsável pela manutenção da temperatura corporal, produz calor através do catabolismo de substratos energéticos. Os adipócitos marrons são ricos em UCP-1 (Proteína de desacoplamento uncopolina 1), proteína presente na membrana mitocondrial que participa nas vias catabólicas de lipídios e carboidratos para termogênese. UCP-1 é expressa exclusivamente no tecido adiposo marrom, sendo que um aumento da massa de tecido marrom pode melhorar a dissipação de energia e o quadro de obesidade (FENZL, A.; KIEFER, F.W. et al 2014).

O tecido adiposo marrom aumenta durante a gestação, reduz no final da gestação e hipertrofia novamente na lactação como forma de priorizar a nutrição do feto. (AGUIS, L.; WILLIAMS, D.H 1980). ANDREWS et al., (1986) relataram que a RA impede a hipertrofia do tecido marrom no final da gestação e durante a lactação.

A RA reduziu o consumo de oxigênio pelo tecido adiposo marrom reduziu o conteúdo de DNA mitocondrial na gordura marrom (ELSUKOVA, E.L et al., 2012). Contudo, a RA já aumentou a capacidade termogênica (HAGEN, J.H 1985).

Evidências recentes apontam as consequências da RA gestacional no tecido adiposo marrom da prole, ocasionando redução da expressão de UCP-1 por consequência reduzindo a termogênese, e reduzindo a expressão de proteínas mitocondriais (AKITAKE, Y. et al., 2014).

Em nosso estudo, observou-se uma redução da área dos adipócitos marrons maternos, coletados no 10º dpg, período equivalente a metade gestacional em roedores. A redução da área dos adipócitos do grupo RA corrobora com os efeitos da RA sobre o tecido adiposo marrom já descrito na literatura (ELSUKOVA, E.L et al., 2012). No entanto, também sobre esse parâmetro (área dos adipócitos marrons), o tratamento com Met não foi capaz de impedir os efeitos da restrição alimentar.

Portanto, todas as nossas análises demonstraram que o bloqueio da síntese de glicocorticoides por Met não foi capaz de impedir os efeitos nocivos da restrição alimentar durante a gestação, ou seja, o tratamento com metirapona não foi capaz de manter a homeostasia uterina. Esses resultados, em conjunto, sugerem que a RA

durante a gestação causa efeitos que vão além do estresse que provoca a síntese de glicocorticoides, causando até mesmo um atraso na diferenciação das uNK e na capacidade de resposta frente ao insulto causado por Met.

8 CONCLUSÕES

- A restrição alimentar do 1º ao 10º dgd diminui a viabilidade gestacional sem, contudo, diminuir o número de sítios de implantação, peso, número e tamanho dos filhotes caracterizando um tempo de resposta –tudo ou nada do organismo gestante frente a restrição alimentar crônica.

- Tanto a Met quanto a restrição alimentar são capazes de induzir comportamento do tipo ansiedade em animais prenhes, reduzindo a atividade locomotora. Porém, a Met não impediu os efeitos da RA.

- A restrição alimentar em camundongos prenhes altera as uNK DBA⁺ para células de aspecto menor e com poucos grânulos semelhantes à células uNK menos diferenciadas descritas na literatura.

- Met administrada em altas concentrações durante a prenhez inicial de camundongos causa 100% de perda gestacional.

- O efeito da interrupção da prenhez em camundongos por parte da Met é dose dependente, sendo que a dosagem de 0,5mg/ml/Kg não causa aborto.

- A administração de Met nas fases iniciais da gestação em animais prenhes submetidos a dieta *ad libitum* foi capaz de alterar as uNK DBA⁺⁺, possibilitando a observação de muitas DBA^{low}uNK , células que podem restaurar a homeostasia uterina após o insulto por Met, de maneira semelhante ao encontrado em outros estudos em camundongos prenhes após ingestão de dieta hiperlipídica, hipercalórica ou infecção mimetizada pelo LPS.

- A Met não é capaz de impedir os efeitos deletérios na gestação causados pela restrição alimentar na prenhez inicial de camundongos.

- No entanto, a restrição alimentar parece impedir a diferenciação plena

das uNK o que pode prejudicar a ativação das uNK, impedindo a manutenção da homeostasia uterina durante a gestação em animais submetidos a Restrição alimentar e Met.

- A RA reduziu a area dos adipócitos marrons.
- A Met diminuiu ainda mais a viabilidade gestacional em animais submetidos a restrição alimentar.
- Os glicocorticóides, no início da gestação, possuem um papel protetor e mimetizador de insultos a gestação. A inibição da síntese de glicocorticóides reduz a viabilidade gestacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A BÍBLIA. **Salmo 144**. Editora Ave Maria, 208ª edição. 1630 pgs.2016.

A BÍBLIA. **Epístola dos Romanos**, capítulo 8, versículo 28. Editora Ave Maria,208ª edição.1630 pgs.2016.

A BÍBLIA. **Evangelho segundo São Mateus**, capítulo 11, versículo 28-30.Editora Ave Maria, 208ª edição.1630 pgs.2016.

AGUIS,L;WILLIAMSON,D.H. Lipogenesis intercapsular brown adipose tissue of virgin, pregnant and lactating rats. The effects os intragastric feeding. **Biochemical Journal**, London, v.190, p.477-480, 1980.

AKITAKE, Y. et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. **Nutrition research**. Califórnia, v.3 5, p. 76 – 87, 2014.

ANDONIOU, C.E; ANDREWS, D.M; ESPOSTI, D.M.A. Natural killer cells in viral infection: more than Just killers. **Immunology**,Amsterdã, v.214, p.239-250, 2006.

ANDREWS,J.F et al. Brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in mice. **Ann Nutr Metab.**, Suíça, V.30, p.87-93, 1986.

ARAMINAITE,V. et al. Maternal caloric restricition prior to pregancy increases the body weight of the second-generation male offspring and shortens their longevity in rats.**The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Japão,v.234,p.41-50,2014.

ASHKAR AA, CROY BA. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Semin Immunol.**, USA, v. 13, n. 4, p. 235-41. 2001.

ASHKAR, A.A. et al. Assesment of requeriments for IL15 and IFN regulatory factors

in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **Journal of Immunology**,USA, v.71, p. 2937-2944, 2003.

BARBALHO, C. A. **Papel dos Receptores GABA benzodiazepínicos da Amígdala na Modulação da Ansiedade em Camundongos Ingênuos e Reexpostos ao Labirinto em Cruz Elevado**. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). UFSCAR,São Paulo. 2007.

BARKER, DJ. OSMOND, C. Infantil mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, Reino Unido, v.1, p.1077-1081, 1986.

BERG, B.N. dietary restriction and reproduction in the rat. **J Nutrition.**, USA, V. 87,p.365-350,1965.

BLONDEAU. B. et al. Glucocorticoids impair fetal beta cell development in rats. **Am BRENT, N. et al. Metyrapone e restores the febrile response to Escherichia coli LPS in pregnant rats. American Journal of Physiology, regulatory, integratory, comparative physiology**, Madrid, v. 300, p.1588-159-213, 2001.

BRUNTON, P. J. et al., Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology** ,EUA,v.20,p.764–776,2008.

BRUNTON, P. J. et al., Endogenous opioids and attenuated hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge in pregnant rats. **Journal of Neuroscience**,EUA,v. 25,n.21,p.5117- 26. 2005.

BRUNTON, P.J. Resetting the Dynamic Range of Hypothalamic-Pituitar-Adrenal Axis Stress Responses Through Pregnancy. **Journal of Neuroendocrinology**,EUA, vol. 22, p.1198-1213,2010.

BULMER,J.N; SUTHERLAND,C.A. Bone-marrow origin of endometrial granulocytes in the early human placental bed. **J Reprod Imunnol.** , EUA, v.5, p. 383-387, 1983.

CANINI, F. et al. Metyrapone decreases locomotion acutely. **Neuroscience Letters**, Amsterdã, v.457, PG.41-49, 2009.

CARAUX, A. et al. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. **Nature Immunology**, USA, v.7, n.7, pg.747-754, 2006.

CAROLA, V. et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behavioral Brain Research**, Amsterdã, v.134, p.49-57, 2002.

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

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Amsterdã ,v.25, p. 235-260, 2001.

COLE J.C.; RODGERS, J.R. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav Pharmacol.** , Filadélfia, v.4, n.6, p.573-580, 1993

COOKE, P.S. et al. Uterine glands development, function and experimental model systems. **Molecular Human Reproduction.**, USA,v.19,p.547-558,setembro 2013.

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

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, Amsterdã,v.49, p.171-176, 1994.

DESAI,M.; ROSS,M.G. Fetal Programming of Adipose Tissue: Effects of IUGR and Maternal Obesity/High Fat Diet. **Semin Reprod Med.**, Canadá, v.29, n.3, p. 237–245, 2011.<doi:10.1055/s-0031-1275517>.

Di S, et al. Glucocorticoids regulates glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. **J Neurosci**,USA,v.29,p.393–401,2009.

DROUET, J. B. Metyrapone blunts stress-induced hyperthermia and increased locomotor activity independently of glucocorticoids and neurosteroids. **Psychoneuroendocrinology**, Amsterdã,v. 35,p. 1299-1310, 2011.

ELSUKOVA, E.I. et al. Effects of long-term food restriction under thermoneutral conditions on brown adipose tissue of laboratory mice. **Ekspierimental noi Biologii I Meditsiny**, China, v.159, p.553-556,2012.

ERLEBACHER,A. Immunology of the maternal-fetal interface. **Annu.Rev.Immunol.**Índia, vol.31, p.387-411, 2013.

FALL, C.H et. al. Fetal growth and coronary heart disease in south India. **Lancet.**, Reino Unido, v.348, pg.1269-1273, 1995.

FENZL, A; KIEFER, F.W. Brown adipose tissue and thermogenesis. **Horm Mol Biol Clin Invest** ,Alemanha,v.19,n.1,p.25–37, 2014.

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**,Araraquara, v. 4, p. 45-56, 1992.

FONSECA, Wesley Fernandes. **Influência dos glicocorticoides no comportamento doentio induzido pelo LPS de E. coli em camundongos prenhes.** 154 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Alfenas,

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Alfenas, 2015, 2015. Disponível em: <<http://lattes.cnpq.br/8491456297983856>>. Acesso em: 1 mar. 2018.

FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.J. Endocrine regulation of feto-placental growth.

GAO, J. et al. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. **Nature**, Reino Unido, v.466, p.1105-1109, 2009.

GIANLORENÇO, A.C.L. **Papel do Sistema Histaminérgico na memória emocional de camundongos expostos e reexpostos ao labirinto em cruz elevado**. Dissertação (Mestrado). 94f. Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos. 2009.

GIOVAMBATISTA, A. et al. Metabolic, neuroendocrine and immune functions in basal conditions and during the acute phase response to endotoxic shock in undernourished rats. **Neuroimmunomodulation**, Suíça, v.7, pg.92-98, 2000.

GOOD e GILMAN: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan 2003.

GRIGOROV, I. et al. . The effect of chronic food restriction on liver acute phase protein response in female and male Wistar rats. **Acta Veterinaria** (Beograd), Sérvia, vol. 5, n. 1, p. 13-20, 2004.

GUARNIERI, D.J et al. Gene profiling reveals a role for stress hormones in the molecular and behavioral response to food restriction. **Biol Psychiatr.**, Amsterdã, v.71, p.358-365, 2012.

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

HABIB, S. et al. Evidence that prenatal programming of hypertension by dietary protein deprivation is mediated by fetal glucocorticoid exposure. **American Journal of Hypertension**, EUA, vol.24, p.96-101, 2011.

HAGEN, J.H. Food restriction increases torpor and improves Brown adipose tissue thermogenesis in ob/ob mice. **American Physiological Society**, EUA, v.5,n.1,p.31-39,1985 .<DOI: 200.131.224.002>

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**,EUA, v.18, p.385-403; 1934.

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

HARRATH, A. et al. Food restriction during pregnancy and female offspring fertility: adverse effects of reproductive lifespan. **J Ovarian Res.**, USA, v.10,n.1,p.31-77, 2017.

HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. **Hormones and Behavior.**,Amsterdã, v. 59, p. 279-289, 2010.

HERMAN, J.P., et al.Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription in vivo. **Mol. Endocrinol.**, Reino Unido, v. 6, p.1061—1069. 1992.

HERRERA E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. 2000. **Eur J Clin Nutr**,Índia,v.54, p. 47-51, 2000.

HOET, J.J; OZANNE,S.;REUSENS,B. Influences of Pre- and Postnatal Nutritional Exposures on Vascular/Endocrine Systems in Animals. **Environmental Health Perspectives** * EUA, v.108,Vol 108,p.563-568,2000.

HOROWITZ, A.K et al. Activation of natural killer cells during microbial infections.**Frontiers in Immunology**, EUA,v.2, p. 22-88, 2012.

HUESON,C.M.; DEAK,T. On the time course, generality, and regulation of plasma progesterone release in male rats by stress exposure. **Endocrinology**,Reino Unido, v.155,p. 3527–3537, 2014.

HVIID, T.V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Hum Reprod Update**,Reino Unido,v.12,n.3,p.2-209, 2006.

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

JENKINS, J. S. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. **Science**,EUA,v.128,n.3322,p.473-480, 1958.

JONES, H.E. Drug addiction during pregnancy:Advances in maternal treatment and understanding child outcomes. **Current Directions for Psychological Science**, EUA,v.15, p.126-130,2006.

JONHSON, F. et al. Long term outcomes after repeat doses of antenatal corticosteroids. **N. Engl. J. Med**,Inglaterra, v.357, p.1190-1198, 2007.

JOUSSE, C. Perinatal protein malnutrition affects mitochondrial function in adult and results in a resistance to high fat diet induced obesity. **Plos one**. Aug 13;9(8),2014. <Disponível em: <http://dx.doi-org/10.1371/journal.pone.0104896>.> Acessado em 20 de setembro de 2016.

KALAFATAKIS, K. et al. Effects of the pattern of glucocorticoids replacement on neural processing, emotional reactivity and well being in healthy male individuals study protocol for a randomized controlled trial. **Bio Med Central**. Janeiro 2016. <Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4724084/>. Acesso em 25 de setembro de 2016.>

KHORRAM, O. et al. Excess maternal glucocorticoids in response to in útero undernutrition inhibit offspring angiogenesis. **Reproductive Sciences**, EUA,v. 21,n.5,p.601-611,2014.

KHORRAM, O.; CHUANG,T.D; PEARCE,W.I. Long term effects of maternal undernutrition on offspring carotid artery remodeling: role of miR-29c. **Journal of Development origins of health and disease**. v.6, p. 342-349, <DOI: 10.1017/52090174415001208.2015.>

KIESSLING R, KLEIN E,WIGZELL H.. Natura killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur J Immunol.**, Alemanha, v. 2,p.112-117,1975.

KNIGHT, B.S. et al. The impact of murine strain and sex on postnatal development after maternal dietary restriction during pregnancy. **J. Physiol.**, EUA, v.581,p 873-884,2007.

LACERDA, G.F.M. L de. **Ansiedade em modelos animais: efeitos de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. Dissertação (Mestrado). 74f. Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

LANGLEY-EVANS, S.C.Developmental programming of health and disease.**Proc. Nutri Soc.**, Reino Unido, v.65, n.1,p.97-105,2006.

LEIZEA, J.P et al. The effects of food restriction on maternal endocrine adaptations in pregnant rats. **J Endocrinol. Invest.**,Itália, v. 22, p. 327-332.1999.

LIDDLE, G.W. et al. Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 beta-hydroxilation. **J Clin Endocrinol Metab.**,EUA V.18, n.8, p.906-912, 1958.

LIMA, P.D et al. Ly49 receptors activate angiogenic mouse DBA(+) uterine natural killer cells. **Cell Mol Immunol.**, EUA, v.11, p.167-476,2014.

LISTER, G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther**, Amsterdã,v.46, p.321-340, 1990.

LIU, J.H; RELAR; R.W.Endocrinology of pregnancy in maternal fetal medicine: principles and practice. **Creasy, R.H, H.S**, Filadélfia,v.8,p. 379-391, 1999.

MAGALHÃES, C.P.; et al. Programação Perinatal e o Comportamento Emocional em Ratos. **Neurobiology**, Piracicaba,v.74, p.1-20, 2011.

MARTINEZ, J. C. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. **Behavioural Processes**,EUA, v.60, p.15-26, 2002.

MATSUOKA, H. et al. Molecular mechanisms supporting a raracrinel role of GABA in rat adrenal medullary cells. **J Physiol.**,Reino Unido, v.586,p. 4825-4842.2008.

MEYER, J.S. Early adrenolectomy stimulates subsequent growth and development of the rate brain. **Exp. Neurol.**, Reino Unido, v.82.,p. 432-436, 1983.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 145-151, abr./ jun. 2006.

MILOSEVIC, V, JL et al. The effect of chronic food restriction on immunopositive ACTH cells in peripebortal female rats. General **Physiology and Biophysics**.v.30 (3):pg. 321-324, 2011.

MITCHELL, M. et al. Metabolic and mitochondrial dysfunction in early mouse embryos following maternal dietary protein intervention. **Biology of Reprouction**, v.80, n.4, pg 622-630, 2009.

MOFFET,A.; SHREEVE,N. First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. **Human Reproduction**, v.30, n.7 ,p. 1519–1525, 2015.

OSOL, G; MANDALA, M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy.

Physiology, Bethesda, 24:58-71, 2009.

PAEK, D.S. et al. Metyrapone alleviates deleterious effects of maternal food restriction on lung development and growth of rat offspring. **Reprod Sciences**. Junho 2014. Disponível em: <http://rsx.sagepub.com/content/early/2014/06/06/1933719114537712>. Acesso em 27 de setembro de 2015.

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

PARNHAM, M. J. The effect of metyrapone on uterine prostaglandin output and smooth. **Eur J Pharmacol**. v.40, p.285–290, 1976.

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.

VOLTOLINI, C ;PETRAGLIA, F. Neuroendocrinology of pregnancy and parturition.

Physiology, Bethesda, 24:58-71, 2014.

PROUD, D; SUBAUSTE, M.C.Glucocorticoids do not alter peptidase expression on a human bronchial epithelial cell line. **American Journal of Respiratory Cell and molecular biology**, v.11, n.1, pg. 57-65, 1994.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology** v. 60061, p.1- 31, 2003.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research**. V.85, p.57-69, 1997.

RATSEP, M.T. et al. Uterine natural killer cells: supervisory of vasculature constriction in early deciduas basalis. **Reproduction**, Ontario, 15 de julho de 2014. Disponível em <<http://www.reproduction-online.org./content/149/2/R91.full>> Acesso em 28 de setembro de 2016.

ROTHWELL,N.J;STOCK,M.J. Effects of denervation brown adipose tissue on the responses to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. **J Physiology**.v.355, p.457-463, 1984.

ROTLLANT, D. ARMARIO, A. A single dose of metyrapone caused long-term dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. **Neuroscienc**. v.130, p.427-434,2005.

SALLES, Évila da Silva Lopes. **Responsividade das células natural killer uterinas DBA+ às alterações nutricionais durante a prenhez de camundongos**. 131 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Alfenas, Programa de Pós-Graduação em Bionciência Aplicado à Saúde, Alfenas, MG, 2014, 2014. Disponível em: <<http://lattes.cnpq.br/5207180496349657>>. Acesso em: 14 mar. 2017. Disponível em: <<http://lattes.cnpq.br/4193402330362099>>. Acesso em: 14 mar. 2017. Disponível em: <<https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/469>>. Acesso em: 14 mar. 2017.

SARAFANA, S. et al. Aspectos da imunologia da gravidez. **Rev. Acta Med Porto**, Lisboa, n.20, pg. 355-358, 2007.

SCHETTER, D.C. Maternal stress a preterm delivery. **Pren Neonatal Med**.,v.3,p.39-42, 1998.

SCHULZ, L.C et al. Leptin and the Placental Response to Maternal Food Restriction during Early Pregnancy in Mice. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v.5,p.87-120,2012<DOI 10.1095/biolreprod.112.103218>

SERAFIM, K.R. **L-Histidina reduz déficit estado dependente na evocação da memória em camundongos reexpostos ao labirinto em cruz elevado**.

Dissertação (Mestrado). 66f. Pós Graduação na Universidade Federal de São Carlos, para o título de Mestre em Fisioterapia. São Carlos. 2008.

SHARMA,U. et al. A disease module in the interactome explains disease heterogeneity, drug response and captures novel pathways and genes in asthma, **Hum Mol Genet.** v.24,n.1,p.3005-3020,2015.

SHISHKINA, G.T et al. Anti apoptotic protein Bcl-xL expression in the mid brain raphe region is sensitive to stress and glucocorticoids. **Plos one**, v.12,p.1-10, 2015. <DOI:10.1371/journal.pone.0143978.>

SOMA-PILLAY, P. et al. Physiological changes in pregnancy. **Cardiovasc J Afr.** v.27 n.2, p. 89-94, 2016.

SONCIN,F.;NATALE,D.;PARAST,M.M. Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. **Cell Mol Life Sci.**,v.72,n.7,p.1291-1302,2015.< Doi: 10.1007/s00018-014-1794-x. >

SPANGELO&MACLEOD. Production of interleucina-6 by anterior pituitary cells in vitro. **Endocrinology**, v.126,n.1, p.582-586,1990.

STEWART IJ, PEEL S. Mouse metrial gland cells do not kill Yac-1 myeloma cells. **J Reprod Immunol.**,v.24,n.2,p.165-171,1993.

STÖHR, T. et al. Rat strain differences in open field behavior and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.59,n.4,p. 813-818; 1998.

THOMPSON, B. G.JR; YOUNG, W.F.Role for laparoscopic adrenalectomy in patients with Cushing's syndrome. **Arq. Bras. Endoc Metab**, n.51, v.8, pg. 1349-1354, 2007.

TOYAMA, R.P. **Avaliação comportamental e bioquímica de camundongos submetidos a um modelo experimental de inflamação associada a criolesão.**

Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas. UFSC, Florianópolis, 2012.

USKOKOVIC, A. et al. . Differences between Molecular Mechanisms Involved in the Regulation of Haptoglobin Gene Expression during the Acute Phase Response and Dietary Restriction. **Folia Biologica** (Praha) v.457, n.55, p. 41–44, 2009.

VERICA, Lj. et al. The effect of chronic food restriction on immunopositive ACTH cells in peripubertal female rats. **Gen. Physiol. Biophys.** , v.30, p. 321–324, 2011.

VIEAU D, et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology.** ,v.1,p.16-20,2007.

VIVIER,E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**,v.331,p,44–49,2011.

WARNES, K.E et al. The effect of intrafetal infusion of Metyrapone on arterial blood pressure response to angiotensin II in the sheep fetus during late gestation **J Physiol**, v.552, n.2, pg.621-633, 2003.

WATANABE, M.A.E et al. **Gestação:um desafio imunológico**.Semina:Ciências Biológicas e da saúde,Londrina.V.35,n.2,p.147-162,2014.

WELBERG LAM, SECKL JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **J Neuroendocrinol**; v.13,p. 113–128,2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**.. Geneva (CH): WHO; v.311,2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Essential nutrition actions**: improving maternal, newborn, infant and Young child healths and nutrition.v.122,Geneva 27,pg.15,2013.

XIONG, S. et al. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2SS1 enhances placentation. **J Clin Invest.**, EUA, v.10, p.4264-4272, 2013.


YEHUDE, R.; FAIRMAN, K.R; MEYER, J.S. Enhances brain cell proliferation following early adrenalectomy in rats. **J Neurochem.**, Reino Unido, v. 8, p. 241-253, 1989.

YOKOYAMA, M. et al. Tissue-resident natural killer cells. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. **LXXVIII.** 2014.
<DOI:10.1101/sqb.2013.78.020354.>

Zavan B, De Almeida EM, Salles Éda S, do Amarante-Paffaro AM, Paffaro VA Jr. COX-2 plays a role in angiogenic DBA (+) uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. **Placenta.** Canadá, v. 44, p.34-45. 2016.

ANEXOS

Anexo A- Certificado

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1083</p>																			
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL</p>																				
<p>CERTIFICADO</p>																				
<p>Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação dos efeitos da metirapona sobre a gestação de camundongos submetidos à restrição alimentar”, registrada com o nº 18/2017, sob a responsabilidade de Valdemar Antonio Paffaro Júnior, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.</p>																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Finalidade</td> <td style="width: 30%;"><input type="checkbox"/> Ensino</td> <td style="width: 30%;"><input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica</td> </tr> <tr> <td>Vigência da autorização</td> <td colspan="2">De 12/06/2017 a 30/07/2018</td> </tr> <tr> <td>Espécie/linhagem/raça</td> <td colspan="2">Camundongo Swiss / heterogênico</td> </tr> <tr> <td>Nº de animais</td> <td colspan="2">100</td> </tr> <tr> <td>Sexo</td> <td colspan="2">Machos: 25 Fêmeas: 75</td> </tr> <tr> <td>Origem</td> <td colspan="2">Biotério Central da UNIFAL</td> </tr> </table>			Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica	Vigência da autorização	De 12/06/2017 a 30/07/2018		Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico		Nº de animais	100		Sexo	Machos: 25 Fêmeas: 75		Origem	Biotério Central da UNIFAL	
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica																		
Vigência da autorização	De 12/06/2017 a 30/07/2018																			
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico																			
Nº de animais	100																			
Sexo	Machos: 25 Fêmeas: 75																			
Origem	Biotério Central da UNIFAL																			
<p>Alfenas, 12 de Junho de 2017.</p>																				
<p> Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida Coordenador CEUA-UNIFAL</p>																				