

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

BRUNO ZAVAN

**Estudo de dois modelos de camundongos durante a
gestação: *I. Síndrome da Resposta Inflamatória
Sistêmica x Nimesulida; II. Deficiência do Fator de
Crescimento Placentário***

Alfenas/MG

2015

BRUNO ZAVAN

**Estudo de dois modelos de camundongos durante a
gestação: *I. Síndrome da Resposta Inflamatória
Sistêmica x Nimesulida; II. Deficiência do Fator de
Crescimento Placentário***

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

Orientador: Prof. Dr Valdemar A. Paffaro Junior
(Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG)

Supervisora: Profa. Dra. Barbara Anne Croy
(Queen's University – Kingston – ON, Canadá).

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Zavan, Bruno

Estudo de dois modelos de camundongos durante a gestação: I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica x Nimesulida; II. Deficiência do Fator de Crescimento Placentário. / Bruno Zavan. -- Alfenas/MG, 2015.
199 f.

Orientador: Valdemar A. Paffaro Junior
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Células Killer. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Ciclo-Oxigenase 2. 4. Gravidez. I. Paffaro Junior, Valdemar A. II. Título.

CDD-571.1

Zavan, Bruno. Estudo de dois modelos de camundongos durante a gestação: I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica x Nimesulida; II. Deficiência do Fator de Crescimento Placentário

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 30/07/15

Prof. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Marisa Ionta

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. MARA SANDRA HOSHIDA

Instituição: FM-USP

Assinatura Mara S. Hoshida

Prof. Rauli Soncini

Rauli Soncini

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Marcia Cristina Bizinotto de Assunção

Instituição: UNIFAL

Assinatura: Marcia C. Bizinotto

Alfenas/MG

2015

**Dedico aos meus pais,
Sérgio e Sandra, por todo
apoio, confiança e carinho;
e aos meus irmãos, Cinthia
e Vinícius, pelo afeto e
companheirismo.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por caminhar ao meu lado e me propiciar ensinamentos até mesmo nas dificuldades.

Aos meus pais, Sérgio e Sandra, que despertaram em mim o amor pela ciência. Agradeço por estarem sempre presentes, apoiando nas horas difíceis e celebrando as conquistas.

Aos meus irmãos, Cinthia e Vinícius, exemplos de determinação e amor pela profissão.

À Raquel Herthel da Cunha pelo amor, pelos cuidados, pela compreensão e por me fazer crescer e aprender mais a cada dia.

A todos os colegas de laboratório, em especial ao Renato, Eliana, Évila e Wesley pelas conversas, companheirismo, apoio e troca de conhecimento.

À Universidade Federal de Alfenas e à Queen's University por dar todo o suporte necessário para a minha formação acadêmica.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por promover o desenvolvimento intelectual e formação de profissionais aptos para desempenhar atividades de pesquisa e magistério superior.

Ao Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior, pela orientação neste trabalho, mas acima de tudo pela amizade, por alimentar o interesse em busca do conhecimento científico e pelos ensinamentos de outros valores, até mesmo mais importantes, que lapidaram minha formação como pessoa. Obrigado por esses 11

anos repletos de momentos de ensinamentos, orientações, auxílios, congressos, viagens, cervejas, futebol e risadas. E que isso não tenha fim.

À professora Dra. Andréa M. do Amarante Paffaro pela contribuição intelectual nesse trabalho.

Aos professores, técnicos e funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) por todo auxílio e pela ótima convivência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado e Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
	CAPÍTULO I	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	1217
2.1	CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS.	17
2.2	FUNÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS	24
2.3	SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E GESTAÇÃO ..	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVOS GERAIS	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	ANIMAIS	35
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DE MATERIAL	35
5.3	TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	36
5.4	CITOQUÍMICA DE LECTINA DBA.	37
5.5	ESTUDO ESTEREOLÓGICO.....	37
5.6	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA α -ACTINA E PERFORINA	37
5.7	QUANTIDADE DA NINHADA E ANÁLISE DAS ARTÉRIAS UTERINAS.....	39
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6	RESULTADOS	40
6.1	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ASSOCIADO À ANSIEDADE	40
6.2	MORFOLOGIA DAS CÉLULAS UNK DBA ⁺	41
6.3	ANÁLISE ESTEROLÓGICA DAS CÉLULAS UNK DBA ⁺	43
6.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ARTÉRIAS UTERINAS E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA α -ACTINA.....	48
6.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PERFORINA	50
6.6	TAMANHO E PESO DA PROLE	51
7	DISCUSSÃO	53
	CAPÍTULO II	60
2	REVISÃO DE LITERATURA	66
3	JUSTIFICATIVA	71

4	OBJETIVOS	73
4.1	OBJETIVOS GERAIS	73
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
5	MATERIAL E METODOS	75
5.1	ANIMAIS	75
5.2	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO	75
5.3	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA	76
5.3.1	<i>Radiotelemetria</i>	76
5.3.2	<i>Pletismografia de cauda</i>	77
5.3.3	<i>Ecocardiografia</i>	77
5.4	ANÁLISE DA MASSA CARDÍACA E RENAL.	78
5.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	78
5.6	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS CARDÍACOS	79
5.7	MOLDAGEM VASCULAR COM POLÍMERO	80
5.8	TESTES COMPORTAMENTAIS	80
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
6	RESULTADOS	83
6.1	NÍVEIS DE PGF PLASMÁTICO DETECTADOS POR ELISA	83
6.2	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA.....	84
6.3	ANÁLISE ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA CARDÍACA	90
6.4	ANÁLISE ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA RENAL.....	92
6.5	EXPRESSÃO DE GENES NO VENTRÍCULO ESQUERDO	93
6.6	MOLDAGEM VASCULAR COM POLÍMERO	94
6.7	ESTUDOS COMPORTAMENTAIS	95
7	DISCUSSÃO	97
8	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	109
	ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

A gravidez é um fenômeno que, para que seja viável, depende de importantes eventos incluindo o processo de implantação, invasão trofoblástica, desenvolvimento placentário e proteção imunológica. Tais eventos são regulados por células e mediadores imunológicos que estão em grande quantidade na interface materno-fetal, e que ao mesmo tempo em que dão suporte aos eventos gestacionais devem apresentar tolerância ao feto em desenvolvimento.

O sucesso da implantação do embrião e seu desenvolvimento parecem estar intimamente relacionados com o balanço de citocinas pró-inflamatórias (Th1 – provenientes de células *T helper 1*) e anti-inflamatórias (Th2 – provenientes de células *T helper 2*) que garantem a tolerância do organismo materno ao feto. Além disso, as células imunológicas maternas interagem com células fetais a fim de criarem um microambiente adequado para o bom andamento da gestação.

As células Natural Killer uterinas (uNK) são bastante representativas neste ambiente, e estudos sugerem que estas células maternas interagem com células trofoblásticas (fetais) modulando a produção de citocinas e fatores angiogênicos controlando a invasão trofoblástica e o remodelamento tecidual.

A infecção intra-uterina foi reconhecida como a causa primária de partos prematuros. Mesmo sem manifestações clínicas a infecção intra-uterina desencadeia na interface materno-fetal um mecanismo inflamatório que envolve a produção de citocinas, uterotônicos potentes, e metaloproteases, o que resulta em diminuição prematura do comprimento cervical uterino, contração uterina, ruptura das membranas fetais causando o parto prematuro.

A inflamação pode ser induzida em animais experimentais através da exposição aos produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, como o lipopolissacarídeo (LPS), mimetizando várias das respostas inflamatórias de fase aguda, sem causar infecção ao hospedeiro.

A Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) durante a gestação é um evento de alta mortalidade, cuja fisiopatologia permanece em contínua investigação. As alterações fisiológicas da gestação podem mascarar ou mesmo agravar seu quadro clínico e, portanto, estudos são de fundamental importância

para possibilitar o diagnóstico precoce, o qual é elemento crucial para o prognóstico materno e fetal.

A administração de LPS durante a gestação pode alterar a biologia células *Naturais Killer* uterina, podendo refletir em alterações morfofisiológicas dessas células no que diz respeito, por exemplo, à ativação de sua citotoxicidade pela liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos como por exemplo a perforina.

É de conhecimento que as células uNK desempenham papel fundamental no desenvolvimento das artérias espiraladas do útero pela secreção de substâncias vasoativas como INF- γ , VEGF, NO, entre outros.

Alterações na morfologia das células uNK acompanhadas pela alteração na quantidade de cada subtipo dessas células no útero de camundongos sob efeito do LPS podem estar associadas à função vasoativa dessas células podendo levar às alterações no diâmetro das artérias espiraladas que nutrem o embrião. O aumento da atividade vasoativa das células uNK pode ser um reflexo à alteração da homeostasia uterina após a indução da SRIS causada pelo LPS.

Desde o surgimento da linha de estudos da Imunologia da Reprodução, quando Peter Medawar levantou o questionamento do porque que um feto semialogênico não é rejeitado pela mãe, os pesquisadores ficaram curiosos a respeito do papel do sistema imunológico durante a gestação. Entretanto, os estudos direcionam a ocorrência de complicações gestacionais com falha ou anormalidades na angiogênese e no remodelamento vascular o que tem tornado os vasos sanguíneos uterinos, sobretudo as artérias espiraladas da placenta, um importante alvo de estudo por muitos pesquisadores. Nesse sentido, um importante fator que participa dos eventos de angiogênese e remodelamento vascular da interação materno-fetal é o Fator de Crescimento Placentário (PGF).

Durante as fases iniciais de nosso trabalho de doutorado investigamos os efeitos do LPS na gestação de camundongos e quanto a inibição seletiva de COX-2 poderia interferir nesses efeitos. Posteriormente pleiteamos a oportunidade de desempenhar pesquisas na Queen's University lotada em Kingston, Ontário, Canadá, sob a supervisão da Doutora B. Anne Croy. Com a qual investigamos o papel do Fator de Crescimento Placentário durante a gestação de camundongos.

Em 1991, a pesquisadora Dra. Maria Graziella Persico clonou, purificou e nomeou de Fator de Crescimento Placentário (PGF), caracterizando também seu receptor, o Receptor 1 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGFR-1).

A partir de então, em colaboração com o Dr. Peter Carmeliet, foram levantadas fortes evidências de que a carência desse fator causava deficiência no processo de angiogênese e arteriogênese em situações patológicas como isquemia e tumores, nos quais o Fator de Crescimento do Endotelial Vascular (VEGF) está aumentado. Entretanto, esses pesquisadores chegaram à conclusão de que a falta de PGF em camundongos, apesar dessas características supracitadas, parecia não afetar o desenvolvimento, a reprodução e até mesmo a vida pós-natal.

Em contrapartida, estudos histológicos mais recentes, relacionados à análise de sítios de implantação embrionária de camundongos depletados para esse fator, sugeriram que exista um aumento do número de células uNK, bem como redução da região do labirintotrofoblásto com atraso no remodelamento das artérias espiraladas uterinas. Com isso, levantou-se então a questão sobre a verdadeira função do PGF durante a gestação e sua participação no desenvolvimento do concepto e suas consequências na vida adulta.

Complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia (PE), que se caracteriza pelo estabelecimento de um quadro de hipertensão muitas vezes acompanhado de proteinúria, estão associadas com baixos níveis plasmáticos de PGF. Além disso, a pré-eclâmpsia também parece estar relacionada a altos índices de complicações cardiovasculares na mãe e problemas cognitivos em filhos.

A literatura dá suporte à função cardioprotetora do PGF, uma vez que este fator se encontra aumentado em situações de indução de estresse cardíaco e, dessa maneira, o PGF tem sido considerado um candidato atraente para abordagens terapêuticas relacionadas às doenças cardiovasculares.

A PE ameaça à saúde e o bem-estar tanto da mãe quanto do feto e está entre as causas subjacentes fundamentais da prematuridade e restrição de crescimento intrauterino. Assim, afetar o ambiente uterino pode comprometer o desenvolvimento fetal, e a doença hipertensiva pode apontar candidatos, como o PGF por exemplo, que participam dos mecanismos pelos quais a adversidade pré-natal está associada com a função cognitiva na vida adulta e a literatura atual também dá suporte ao fato da maior incidência de déficit cognitivo em filhos nascidos de gestação pré-eclâmpsia.

Por isso, faz-se necessário o preenchimento dessa lacuna no conhecimento que tange essa importante complicação gestacional no que diz respeito à sua

correlação com complicações cardiovasculares e cognitivas futuras, destacando o PGF como candidato à um fator chave nesse processo.

O laboratório da Dr. Anne Croy (Queens University, Kingston, Canadá) é referência internacional em pesquisa e desenvolvimento científico e consiste em um dos maiores núcleos de pesquisa em células uNK e Fator de Crescimento Placentário, sendo que esta pesquisadora tem colaboração com o Dr Peter Carmeliet, o qual retém a patente do uso de camundongos geneticamente depletados para esse fator.

O projeto de doutorado sanduiche, no qual foi procedido o estudo sobre o papel do Fator de Crescimento Placentário durante a gestação, foi aprovado pelo Programa Ciências sem Fronteira (processo número: 245282/2012-2) e avaliado pela supervisora na Queen`s University (Anexo II).

Frente ao fato de nossos estudos de doutorado ocorrerem em duas etapas, a primeira delas realizada no Brasil e a segunda realizada durante o Doutorado Sanduiche, tivemos a oportunidade de trabalhar com dois modelos diferentes em animais de experimentação durante a gestação, que resultaram na organização do presente relatório em 2 capítulos: I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica x Nimesulida; cujo objetivo foi avaliar se a SRIS induzida por LPS em camundongos prenhes no período mediano da gestação era capaz de alterar a distribuição das células uNK DBA⁺, bem como influenciar a remodelação das artérias espiraladas uterinas, enfatizando o envolvimento da COX-2 neste processo pelo uso de seu inibidor específico (Nimesulida), e II. Deficiência de Fator de Crescimento Placentário, cujo objetivo foi avaliar a influência da deficiência de PGF na adaptação cardiovascular e renal durante a gestação, bem como, na vasculogênese cerebral e suas consequências comportamentais em adultos.

CAPÍTULO I

I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica x Nimesulida

RESUMO

Uma das populações de células imunológicas mais abundantes no útero durante a gestação é a das células Natural Killer uterinas (uNK) que, apesar de apresentarem grânulos citoplasmáticos ricos em perforina e granzimas, não apresentam atividade citotóxica durante uma gestação normal. As células uNK são importantes produtoras de fatores angiogênicos que promovem a dilatação e o remodelamento das artérias uterinas resultando no aumento do fluxo sanguíneo para a unidade feto-placentária em desenvolvimento. A administração sistêmica de Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* em camundongos pode desencadear a ativação de cicloxigenase-2 (COX-2) levando a um aumento nos níveis de prostaglandinas bem como um desbalanço das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no útero gestante alterando a atividade normal das células imunológicas refletindo em uma alteração na homeostase uterina. O presente trabalho teve como o objetivo avaliar se a administração do inibidor seletivo de COX-2 pode interferir nos efeitos do LPS no útero gestante, nos vasos sanguíneos decíduais, nas células uNK e na quantidade e qualidade da prole; contribuindo assim para a elucidação dos mecanismos da SRIS durante a gestação. A administração de LPS causou excessivo influxo de células uNK imaturas no útero gravídico, além de causar diminuição do número de células uNK maduras concomitante ao aumento de células uNK alteradas. Tais efeitos do LPS foram prevenidos pelo pré-tratamento com Nimesulida. A inibição da COX-2 também impediu a liberação de perforina por essas células bem como a diminuição da expressão de α -actina em vasos sanguíneos uterinos causados pelo LPS. O número de filhotes nascidos de mães tratadas com nimesulida+LPS no período mediano da gestação foi ainda menor do que o número de filhotes que nasceram das mães que receberam apenas LPS no mesmo dia de gestação. A injeção apenas de nimesulida não causou nenhum

efeito na prole, levando-nos a acreditar que as alterações fisiológicas após a inflamação induzida por LPS são de fundamental importância para o restabelecimento da homeostase do útero, a fim de manter a gestação a termo.

Palavras chave: Natural Killer. Lipopolissacarídeo. Cicloxigenase. Gestação.

ABSTRACT

One of the most abundant immunologic cell types in early decidua is the uterine Natural Killer (uNK) cell that despite the presence of cytoplasmic granules rich in perforin and granzymes does not degranulate in normal pregnancy. UNK cells are important producers of angiogenic factors that permit normal dilation of uterine arteries to provide increased blood flow for the growing fetoplacental unit. Gram-negative bacteria Lipopolysaccharide (LPS) administration can trigger cyclooxygenase-2 (COX-2) activation leading to an increase in prostaglandin level and an imbalance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines impairing the normal immune cells activity as well as uterine homeostasis. The present study aimed to evaluate if COX-2 inhibitor can alter the effect of LPS on the pregnant uterus, on blood vessels of the decidua, on uNK cells and on litter size; thus contributing to the elucidation of Systemic Inflammatory Syndrome mechanisms during pregnancy. The LPS administration caused excessive immature uNK cells influx in pregnant uterus as well as a decrease in mature uNK cells number concomitantly with altered uNK cells increasing. Such LPS effects could be prevented by the nimesulide pretreatment. The COX-2 inhibition has also prevented perforin releasing by these cells as well as the α -actin down-regulation in uterine blood vessels caused by LPS. The number of pups born from mothers treated with Nimesulide + LPS in mid-pregnancy was smaller than the number of pups born of mothers who received only LPS on the same gestation day. The injection of nimesulide itself showed no effect in the offspring, leading us to believe that the physiological changes after inflammation induced by LPS are of fundamental importance for the restoration of uterine homeostasis in order to maintain pregnancy to term.

Keywords: Natural Killer. Lipopolysaccharide. Cyclooxygenase. Pregnancy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	- Área da Luz do Vaso
alt-uNK	- Células uNK alteradas
Ang-2	- Angiopoetina 2
AT	- Área Total
BSA	- Albumina Sérica Bovina
cNK	- Células Natural Killer circulantes
COX	- Cicloxigenase
CSF-1	- Fator Estimulador de Colônias-1
DAB	- Diaminobenzidina
DBA	- <i>Dolichos biflorus</i> aglutinina
DG	- Dia de gestação
dNK	- Células NK decíduais
eNK	- Células NK endometriais
HLA	- Antígeno Leucocitário Humano
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase induzida
IP10	- Proteína Induzida por Interferon 10
LIF	- Fator Inibitório de Leucemia
LPS	- Lipopolissacarídeo
MHC	- Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade
MLAp	- Agregado Linfocitário mesometrial da Prenhez

NK	- Natural Killer
NO	- Óxido Nítrico
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
PBS	- Tampão Fosfato Salina
PE	- Pré-eclâmpsia
PGF	- Fator de Crescimento Placentário
SRIS	- Resposta da Resposta Inflamatória Sistêmica
TGF	- Fator de Crescimento Tumoral
Th1	- Células T Helper 1
Th2	- Células T Helper 2
TLR	- Toll-like-receptor
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
uNK	- Células Natural Killer uterinas
VCAM-1	- Proteína de Adesão Vascular 1
VEGF	- Fator de Crescimento do Endotelial Vascular
VEGFR-1	- Receptor 1 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

2 REVISÃO DE LITERATURA

O texto que segue faz referência às células uNK, objeto de estudo do presente trabalho, bem como à SRIS durante a gestação, contextualizando sua problemática trazendo luz aos objetivos propostos.

2.1 CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS

As células Natural Killer circulantes (cNK) são células com atuação na imunidade inata protegendo o organismo contra células tumorais, parasitas e células infectadas por vírus ou bactéria (TRINCHIERI, 1989). Esta linhagem celular, que se origina de células progenitoras da medula óssea, representa uma pequena fração dos linfócitos do sangue periférico que possui capacidade citotóxica por apresentar grânulos citoplasmáticos contendo perforina além de produzirem granzimas, e são capazes de lisar a célula alvo sem prévia sensibilização (SMYTH, 2005; RITZ et al., 1988).

Diversos organismos expressam o gene que codifica para a síntese de perforina apresentando um elevado grau de conservação entre as espécies, e em todas elas sua função é única e original: ruptura da membrana plasmática da célula alvo (HOVES et al., 2010). Com isso, a perforina representa uma proteína formadora de poros que facilita a entrada de substâncias pró-apoptóticas como as granzimas sendo, portanto, liberadas em situações de atividade citotóxica (KURSCHUS et al., 2008; METKAR et al., 2002). Entretanto, foi demonstrado que as células cNK também participam no sistema imune adaptativo com características como memória adaptativa, aumentando a resposta frente a uma segunda infecção, inclusive com produção de citocinas semelhante as células T de memória (SUN et al., 2009).

Em humanos existem dois subtipos de células NK no sangue periférico que se diferem pela expressão da molécula CD56. As células CD56^{dim} (que apresentam baixa densidade dessa molécula em sua membrana plasmática) representam 90% das células NK periféricas, elas possuem alta densidade de CD16 e têm como

função a defesa do organismo pela citotoxicidade (COOPER et al., 2001; KALKUNTE et al., 2008; GIULIANI et al., 2014). As células CD56^{bright}, por sua vez, são CD16⁻ e são menos citotóxicas quando comparadas com as CD56^{dim} CD16⁺, mas apresentam a grande capacidade de produção de citocinas quando ativadas (BAUME et al., 1992).

As células NK desempenham importantes funções em tecidos mucosos. Sendo o útero um tecido mucoso que libera grandes quantidades de hormônios, propicia o recrutamento massivo de células imunológicas com o objetivo de apoiar o desenvolvimento do embrião durante a gestação (ZHANG et al., 2010).

Estudos realizados por Koopman e colaboradores (2003) avaliaram pela técnica de *microarray*, se as células NK que aparecem na decídua durante o primeiro trimestre da gestação eram semelhantes às células CD56^{bright} ou CD56^{dim}. Os resultados demonstraram que as células NK uterinas (ou NK deciduais, como o autor se refere) apresentam propriedades únicas e devem ser consideradas como sendo um subtipo independente (ACAR et al., 2011).

Sua origem é hematopoiética, onde a linhagem precursora é a linfocitária (CROY, 1997). Estudos feitos por Mingari et al. (1997), Carlyle et al. (1998) e Di Santo (2006) indicam que a maturação final dos precursores das cNK ocorre na periferia, sugerindo a participação do timo, entretanto, ainda existem controvérsias quanto a origem das células uNK.

Alguns pesquisadores sugerem teorias a respeito do aumento dessas células levando em consideração que este fenômeno ocorre na fase secretória do ciclo menstrual e no início da gestação (ACAR et al., 2011). Estudo realizado por Jones e colaboradores (1998) demonstrou que mais de 40% das células uNK CD56⁺ isoladas do endométrio no período secretório do ciclo menstrual expressavam Ki67, proteína associada ao núcleo que exerce função de ativação essencial para proliferação.

A evidente relação entre quantidade de células uNK e o ciclo menstrual sugere a participação dos hormônios estrógeno e progesterona no recrutamento dessas células para o ambiente uterino.

A quantidade dessas células diminui de maneira proporcional à diminuição da concentração de progesterona, sugerindo que a sobrevivência dessas células ocorra de maneira dependente deste hormônio. Por outro lado, a influência da progesterona parece ocorrer de maneira indireta, uma vez que as células uNK não

possuem receptores para tal hormônio (KING et al., 1996). A progesterona se liga aos receptores de células estromais desencadeando um aumento na secreção de interleucina-15 (IL-15) que, segundo Okada et al (2000), por sua vez, pode estimular a proliferação de células uNK sem promover a atividade citotóxica contra células trofoblásticas, fato esse comprovado *in vitro* por Verma e colaboradores (2000). Outros estudos já demonstraram a importância da IL-15 para a diferenciação das células NK (PUZANOV et al., 1996). Para reforçar tal importância, estudos demonstraram que sítios de implantação de camundongos fêmea *Knockout* para IL-15 não possuem células NK e, além disso, não apresentam as modificações esperadas nas artérias espiraladas que nutrem o embrião (ASHKAR et al., 2003).

No endométrio, as células endoteliais não expressam a proteína de adesão vascular 1 (VCAM-1) na fase proliferativa do ciclo menstrual, mas durante a fase secretória passa a expressá-la. Portanto, é possível sugerir que as células uNK utilizam a integrina do grupo $\alpha 4\beta 1$ que se liga à proteína VCAM-1 para a adesão endotelial após a ovulação (ACAR et al., 2011).

No útero de camundongos é notado um influxo de linfócitos por volta do 4º - 5º dia de gestação (DG), período onde ocorre a implantação do blastocisto. Nesse período esses linfócitos são raros, pequenos, e não apresentam grânulos citoplasmáticos. Estes alcançam os sítios de implantação embrionária pela região vascularizada denominada de região mesometrial que expressa VCAM-1 (KRUSE et al., 2002).

Estas células diferenciam a partir do DG6 e este fenômeno é notado em função do acúmulo de grânulos citoplasmáticos nestas células. Estes linfócitos proliferam e diferenciam no útero durante a prenhez, podendo atingir 50 μm de diâmetro e distribuem-se no miométrio e endométrio da região mesometrial de cada sítio de implantação (STEWART; PEEL, 1981; PEEL; STEWART; BULMER, 1983; HEAD, 1996; PAFFARO JR, 2003; BULMER; LASH, 2005). Esta distribuição não está relacionada com a presença de nervos no endométrio uterino (SHEIKHI et al., 2007), mas sim em função de uma matriz extracelular rica em fibronectina, que parece ser utilizada como substrato de migração, favorecendo a proliferação e diferenciação das uNK que expressam a integrina $\alpha 5\beta 1$, concomitante à expressão de fibronectina no útero (ZAVAN et al., 2010). Segundo esse mesmo autor, a ligação entre a integrina $\alpha 5\beta 1$ e a fibronectina parece ser um fator importante para

a sobrevivência dessas células, uma vez que com diminuição da expressão de fibronectina no final da gestação (devido ao avanço da decidualização e consequente diminuição da matriz extracelular) pode ocorrer o desligamento da integrina $\alpha 5\beta 1$ concomitante à diminuição das células uNK no ambiente uterino.

Segundo Chantakru e colaboradores (2001) tais linfócitos contribuem também para a formação de um microdomínio em cada um dos sítios de implantação denominado agregado linfocitário mesometrial da prenhez (MLAp), que também recebe a denominação de glândula metrial apesar de não se constituir em uma estrutura glandular (STEWART; PEEL, 1981; CROY; KISO, 1993; LOKE; KING, 2000; CHANTAKRU et al., 2001).

As células uNK são reativas à marcação com ácido periódico de Schiff's (PAS), reagente histológico que marca glicoproteínas, especialmente mucinas, no entanto, a marcação com este reagente apresenta algumas limitações de análise, tal como a impossibilidade do isolamento das células por essa marcação seguida de análise molecular (CROY et al., 2010). Estudos citoquímicos utilizando a lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) que se liga a glicoconjugados contendo N-Acetil-D-Galactosamina, demonstraram que a membrana plasmática, bem como, os grânulos das células NK uterinas reagem de forma bastante específica com esta lectina. Paffaro-Jr e colaboradores (2003) caracterizaram quatro subtipos correspondentes as formas de diferenciação destas células no útero de camundongos durante a gestação (Figura 1).

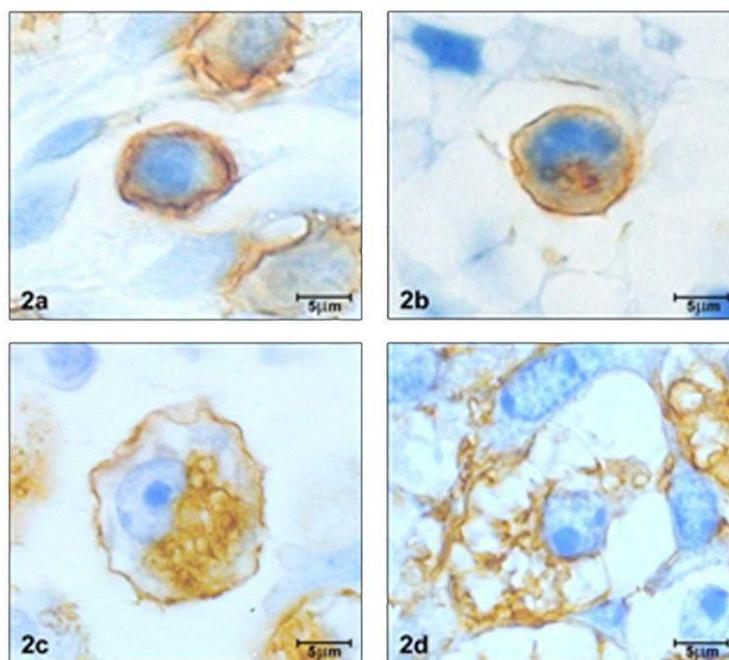


Figura 1 - Padrão de marcação com lectina DBA após reação com peroxidase/diaminobenzidina, distinguindo os quatro subtipos de células uNK de camundongos: subtipo I (A), subtipo II (B), subtipo III (C) e subtipo IV (D).

Fonte: PAFFARO JR et al., 2003.

O *subtipo 1* é composto por células pequenas ($9 \pm 3 \mu\text{m}$) apresentam membrana com forte reatividade à lectina e não apresentam grânulos citoplasmáticos; o *subtipo 2* é representado por células que começam a apresentar alguns grânulos citoplasmáticos e são maiores em diâmetro ($13 \pm 2\mu\text{m}$); as células do *subtipo 3* apresentam aspecto de célula madura, núcleo com nucléolo evidente e muitos grânulos citoplasmáticos ($26 \pm 3 \mu\text{m}$) e; a forma senescente dessa célula é caracterizada como *subtipo 4* apresentando regiões de extração citoplasmática (vacúolos) com conteúdo granular variável e núcleo com cromatina irregular (PAFFARO Jr et al., 2003).

A utilização da técnica de citoquímica de Lectina DBA para estudos das células uNK foi amplamente adotada, não apenas pela possibilidade da identificação dos diferentes subtipos (estágios de diferenciação) dessas células, mas também por permitir o isolamento de RNA após a coleta das células por técnicas de microdissecção a laser dos cortes histológicos de sítio de implantação embrionária. Além disso, a lectina DBA pode ser associada às esferas magnéticas permitindo o isolamento das células uNK a partir de ressuspensão de homogenato da porção mesometrial dos sítios de implantação embrionária (CROY et al., 2010b).

Posteriormente, estas células podem ser utilizadas para a separação de células ativadas por fluorescência, cultura celular de curto prazo ou isolamento de RNA (CROY et al., 2010a).

Estudos utilizando camundongos imunodeficientes comprovaram que estes linfócitos pertencem à linhagem NK. Estas células estão presentes em camundongos SCID (T⁻, B⁻, NK⁺) e ausentes em *tgε26* (NK⁻ T⁻) e em *Rag-2^{-/-} γc^{-/-}* (T, B, NK⁻) (GUIMOND et al., 1997; GUIMOND et al., 1998; CROY et al., 2000). Embora tenham sido caracterizadas como células NK, a morfologia e comportamento peculiar destes linfócitos sugerem que eles representam um subtipo específico do útero durante a gestação, o que lhes conferiu a denominação de células uNK (CROY; KISO, 1993; KING; LOKE, 1991; HEAD, 1996; VAN DEN HEUVEL et al., 2005).

Segundo Ashkar e Croy (1999), as células uNK produzem IFN- γ e essa produção atinge o pico por volta do DG10, estágio em que há um aumento da expressão de eomesodermin (eomes) no endométrio, molécula que parece estar envolvida na regulação da ativação das células uNK para secreção de IFN- γ (TAYADE et al., 2005). Após o período que compreende a metade da gestação, tais células decaem em número tanto em camundongos, em ratos, como em humanos. Por volta do 12º dia de gestação (DG12), células uNK em mitose não são mais encontradas, e a fragmentação da cromatina destas células é um identificador de sua morte por processo de apoptose (DELGADO et al., 1996).

As uNK de camundongos expressam asialo-GM1; NK1.1, Thy-1, PcR, 4H12 e CD45 (PARR et al., 1990; BERNARD et al., 1978; MUKHTAR, 1989; REDLINE; LU, 1989; LINNEMEYER; HAMILTON, 1990; CROY; KISO, 1993; KISO et al., 1992). Os grânulos citoplasmáticos destas células contêm perforina, serina esterases, fosfatases entre outras e glicoproteínas incluindo Muc-1 (PARR et al., 1990; PEEL, 1989; CROY et al., 1997; LIMA, 2014). No entanto, a expressão de receptor de estrógeno parece não ser requerida para a diferenciação e desempenho do papel funcional das células uNK (BORZYCHOWSKI et al., 2003).

Apesar de todo o conhecimento a respeito da atividade citotóxica exercida por outras células NK, as células uNK de camundongos não são capazes de lisar células de mieloma YAC-1 *in vitro* (STEWART; PELL, 1993) e não existem também

evidências *in vivo* da degranulação destas células que indiquem sua atividade citotóxica (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR; CROY, 1999).

As células CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ de humanos são as análogas às uNK de camundongos. Tais células surgem no útero humano durante a fase secretora do ciclo menstrual, e se mantêm durante a gestação, constituindo mais de 70% dos leucócitos decíduais (LOKE; KING, 2000; ERLEBACHER, 2013).

Estudos fenotípicos evidenciaram a existência de dois subtipos diferentes de células uNK em humanos, o que lhes conferiu na literatura duas maneiras diferentes de denominá-las, as células NK endometriais (eNK) e células NK decíduais (dNK) (MANASTER et al., 2010; HO et al., 1996; HANNA et al., 2006; MANASTER; MANDELBOIM, 2010).

As células eNK correspondem ao subtipo encontrado no endométrio uterino não gravídico, enquanto as dNK seriam aquelas que migram para o útero apenas no momento da gestação (MANASTER; MANDELBOIM, 2010). Estudos demonstraram que, apesar de ambas expressarem receptores *KIR*, semelhante às CD56^{dim} e ambas possuírem grânulos citoplasmáticos com conteúdo citolítico, como descrito por Hiby et al. (2008), existe expressão diferencial de moléculas como CD16, que está presente em dNK e ausente em eNK, ou L-selectinas, presentes nas eNK e ausentes nas dNK (HO et al., 1996; ERIKSSON et al., 2004; HIBY et al., 2008; MANASTER; MANDELBOIM, 2010).

Assim como em humanos, em camundongos também é notada a existência de subtipos distintos de uNK, como descrito por Zhang e colaboradores (2010), que demonstraram a existência de uNK PAS⁺DBA⁺, que parecem ter precursores circulantes, e uNK PAS⁺DBA⁻, com precursores intra-uterinos. Segundo esses autores, estas duas populações de células uNK também diferem com relação à sua funcionalidade, no que diz respeito à produção de citocinas e fatores angiogênicos.

Em função dos dados a respeito destas diferentes populações de células uNK (eNK e dNK) serem ainda fragmentados e não conclusivos, e para tornar mais claro a descrição destas células, será utilizada a nomenclatura “uNK” ao se referir às células alvo do presente projeto.

2.2 FUNÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS

As células uNK estão presentes de forma abundante no momento da implantação em diferentes espécies e estão em íntimo contato com as células trofoblásticas, sugerindo que estas sejam alvo das uNK. No entanto, sua proximidade ao trofoblasto extraviloso na interface materno-fetal sugere também que as células uNK possam reconhecer tais células como sendo oriundas do feto e apenas regular sua invasão, como sugerido por Loke e King (1995), uma vez que não apresentam atividade citotóxica contra elas (KING et al., 2000).

As uNK possuem grânulos citoplasmáticos bastante evidentes, e armazenam enzimas como a perforina e granzimas, indicando um potencial citolítico. Kopcow e colaboradores (2005) demonstraram que, apesar das células uNK apresentarem esse potencial, elas também mostram uma redução da sua capacidade citotóxica pela não expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I. Ao mesmo tempo em que tais células formam conjugados e polarizam CD2, LFA-1 e actina pelos contatos focais, também falham em polarizar os centros organizadores de microtúbulos e seus grânulos citoplasmáticos de conteúdo lítico, e isso pode ser um indicativo da falta de citotoxicidade.

Em mulheres, durante a fase secretória do ciclo menstrual é observado o grande aumento em número das células uNK que se mantém neste ambiente na gestação. Se a gestação não ocorrer estas células decaem em número, com isso, ocorre uma redução na produção de fatores solúveis que mantém a integridade vascular o que pode estar relacionado com o desencadeamento da menstruação. Portanto, as células uNK podem ser importantes nos processos de renovação, diferenciação e descamação do endométrio durante o ciclo menstrual (IGARASHI et al., 2001; TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Estudos realizados por Li e colaboradores (2001) corroboram essa hipótese, uma vez que foi verificado a expressão de fator de crescimento endotelial C (VEGF-C), fator de crescimento placentário (PGF), e angiopoetina 2 (Ang-2) na fase secretória, dando estabilidade às artérias endometriais nesse período.

A invasão do trofoblasto extraviloso na decídua e artérias espiraladas é essencial para o estabelecimento do suporte sanguíneo materno ao feto. Tal

processo deve ser cuidadosamente controlado, uma vez que uma invasão exacerbada ou reduzida pode causar consequências indesejadas para a gestação, como por exemplo: pré-eclâmpsia, déficit de crescimento intra-uterino, parto prematuro, aborto e até mesmo complicações como placenta acreta (PIJNENBORG et al., 1983).

O íntimo contato sugere que as células uNK exercem influência sobre a invasividade das células trofoblásticas, no entanto, tal influência não ocorre por meio da citotoxicidade, apesar da presença de receptores de ativação como NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D e 2B4, sua citotoxicidade é reduzida em comparação com as células cNK (KOPCOW et al., 2005; VACCA et al., 2006; HANNA et al., 2006).

De acordo com Trundley e Moffet (2004) a função das células uNK pode ser modificada após a ligação de seus receptores com moléculas de MHC não clássicas (HLA-G, HLA-E e HLA-C) expressas pelas células trofoblásticas, e essa modificação pode influenciar na invasividade trofoblástica.

O mecanismo mais aceito da regulação da invasividade trofoblástica pelas células uNK é com relação a produção de citocinas. Elas secretam uma grande quantidade de fatores de crescimento e citocinas, tais como: Ang-2, identificado por Dink et al. (2000); Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α), identificado por Bauer et al. (2004); Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Crescimento Tumoral – β 1 (TGF- β 1), identificado por Graham et al. (1994) que parecem exercer influência inibitória na capacidade de invasão do trofoblasto; além dessas, a IL-8 e proteína induzida por interferon 10 (IP10) também secretadas pelas células uNK se ligam à receptores das células trofoblásticas induzindo sua migração (HANNA et al., 2006).

Estudos realizados por Von Rango e colaboradores (2003) demonstraram por métodos imunocitoquímicos que muitas células trofoblásticas em apoptose se encontravam rodeadas por células uNK, o que leva a duas interpretações: ou as células uNK desencadearam o processo de apoptose das células trofoblásticas; ou elas foram recrutadas após a apoptose ter sido iniciada.

A função principal das células uNK está relacionada com a manutenção da homeostasia gestacional e controle do remodelamento vascular. Estudos utilizando camundongos prenhes transgênicos tge26 (NK⁻ T⁻ B⁺) demonstraram alta taxa de perda gestacional, e os fetos que sobreviviam apresentavam placenta reduzida e

remodelamento incompleto das artérias espiraladas do útero (GUIMOND; WANG; CROY, 1998).

Em camundongos, as células uNK parecem contribuir para o desenvolvimento normal da placenta e decídua (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR et al., 2000; CROY et al., 2003a; CROY et al., 2003b). As células uNK de humanos podem exercer papel semelhante, visto que estas também produzem moléculas angiogênicas (LANGER et al., 1999; LI et al., 2001; CROY et al., 2003b).

Estas células são capazes de produzir fatores angiogênicos como os pertencentes à família VEGF, PGF, Ang-2 e NKG5 que medeiam a transformação das artérias espiraladas uterinas (HANNA et al., 2006; RÄTSEP et al., 2015).

Estudos realizados por Ashkar e Croy (1999) mensuraram a concentração de IFN- γ em homogenizados da região mesometrial de sítios de implantação embrionárias e identificaram o aumento significativo dessa citocina pro-inflamatória no início da gestação (entre DG5 e 6), período este que coincide com o aumento em número das células uNK. O pico de concentração de IFN- γ ocorre de maneira concomitante ao pico do número de células uNK (DG10). Após esse período, tanto a concentração de IFN- γ quanto a quantidade de uNK decaem até o final da gestação. A produção de IFN- γ pelas células uNK parece ocorrer por estímulo de citocinas pró-inflamatória como IL-12, IL-15 e IL-18 (YU et al., 2006).

Segundo esses mesmos autores, nos sítios de implantação de camundongos *Knockout* para IFN- γ ou para receptores dessa citocina (IFN- γ R1), eram encontradas muitas uNK, *no entanto, estas possuíam tamanho reduzido (indiferenciadas)*, e a modificação esperada das artérias espiraladas não pôde ser constatada.

Portanto, as células uNK em camundongos parecem estar relacionadas com a liberação de citocinas como IFN- γ que leva à dilatação das artérias espiraladas decíduais e manutenção da integridade decidual (ASHKAR; CROY, 1999; ASHKAR et al., 2000). Além do IFN- γ , as uNK de camundongos também secretam fator estimulador de colônias-1 (CSF-1) que contribui para a diferenciação de macrófagos no útero, conforme sugerido por Pollard et al. (1991); *IL-1*, fator inibitório de leucemia (*LIF*), identificado por Croy et al. (1991), fator de necrose tumoral (*TNF- α*) e *VEGF*, conforme sugerido por Lash et al. (2006).

As células uNK de camundongos expressam o gene para a NO sintase induzida iNOS, e o NO derivado dessas células também é importante para o desenvolvimento da vascularização uterina durante a gestação, uma vez que camundongos deficientes em iNOS apresentam anormalidades no desenvolvimento dos vasos (GUIMOND et al., 1997). Dessa forma, a produção de NO pelas uNK parece estar relacionada com o relaxamento das artérias espiraladas uterinas (BURNETT; HUNT, 2000).

2.3 SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E GESTAÇÃO

Em países industrializados cerca de 5 a 11% das crianças nascem prematuramente. O número de partos prematuros, antes de 32 semanas de gestação, é responsável por cerca de 70% das mortes e mais de 75% das morbidades neonatais levando a um déficit neurocognitivo e a disfunção pulmonar nestas crianças (SLATTERY et al., 2002). A infecção intra-uterina foi reconhecida como a causa primária de partos prematuros e corrobora para o desenvolvimento de leucomalácia periventricular e displasia broncopulmonar (GOLDENBERG; HAUTH; ANDREWS, 2000; SLATTERY et al., 2002; YOON et al., 2003). Mesmo sem manifestações clínicas a infecção intra-uterina desencadeia na interface materno-fetal um mecanismo inflamatório que envolve a produção de citocinas, uterotônicos potentes, e metaloproteases, o que resulta em diminuição prematura do comprimento cervical uterino, contração uterina, ruptura das membranas fetais causando o parto prematuro (SCHMITZ et al., 2007).

A ativação da resposta imune ocorre a partir da liberação de padrões moleculares associados ao patógeno, ou seja, endotoxinas da parede celular de gram-negativos (LPS) e exotoxinas de alguns gram-positivos (peptideoglicanas, ácido lipoteicóico). Tais componentes interagem com receptores específicos na superfície de monócitos, denominados *toll-like receptors* (TLR), resultando em uma complexa cascata de eventos que envolvem a ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e a liberação de mediadores inflamatórios (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005; GUINN et al., 2007; SILVA et al., 2008).

As células T CD4 ativadas podem produzir citocinas com atividade pró-inflamatória (TNF- α , interferon- γ , IL-2), ou citocinas com atividade anti-inflamatória (IL-4, IL-10). Os fatores que determinam a predominância de Th1 ou Th2 na SRIS permanecem desconhecidos, mas parecem ser influenciados pelo tipo de patógeno, tamanho do inóculo e local da infecção. Tal síndrome é caracterizada pelo aumento de mediadores inflamatórios, porém, com a progressão do quadro, há uma mudança para um estado de imunossupressão (HOTCHKISS; KARL, 2003).

A reação inflamatória inicial leva à geração de radicais livres e NO sintase. A produção de NO ativa a guanilato ciclase solúvel e gera GMP cíclico, causando desfosforilação da miosina de células musculares dos vasos, além de levar à captação de cálcio, ou seja, diminuição de cálcio intracelular e, conseqüente, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SHEFFIELD, 2004).

Estudos mostram também que o NO em excesso inibe a função mitocondrial da musculatura esquelética, o que dificulta a oxigenação adequada deste tecido (SILVA et al., 2008).

A resposta hemodinâmica acontece de maneira precoce; a redução da resistência vascular leva à queda da pressão arterial, o que provoca taquicardia por estímulo aos barorreceptores. Com isso, há aumento do débito cardíaco e ativação do sistema renina-angiotensina (GUINN et al., 2007).

Estudos em mulheres demonstraram grande concentração das citocinas IL-6 e TNF- α no líquido amniótico, e aumento da concentração de muitas outras citocinas e quimiocinas em pacientes os quais tiveram partos prematuros comparado com aqueles com parto a termo (ROMERO et al., 1995). A injeção sistêmica ou intra-uterina de IL-1 β e TNF- α , bactérias mortas, ou produtos de bactérias induz também o parto prematuro de camundongos e de outros animais (ELOVITZ; MRINALINI, 2004).

A inflamação pode ser induzida em animais experimentais através da exposição aos produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, como o LPS, mimetizando várias das respostas inflamatórias de fase aguda, sem causar infecção ao hospedeiro (BURRELL, 1994). Tal inflamação pode, portanto, induzir anorexia, piroxia, anedonia e várias alterações comportamentais como: a sonolência, redução da atividade motora e exploratória, bem como acentuado estado depressivo (KLUGER, 1991; KENT et al., 1996; DANTZER et al., 1998,

1998b; AVITSUR et al., 1999; HORI et al., 2000; LEONARD, 2001; OWYANG; HASLER, 2002; ENANGA et al., 2002; STEINER; BRANCO, 2003; ROMANOVSKY, 2004; MATSUMURA; KOBAYASHI, 2004; DUNN et al., 2005; ROMANOVSKY et al., 2005; ROMANOVSKY et al., 2006).

Durante a gestação, ocorre diminuição da resistência vascular periférica por influência de mediadores como prostaciclina, NO e hormônios gestacionais; e aumento da frequência cardíaca, com conseqüente queda da pressão arterial e aumento do débito cardíaco. Isso pode não apenas mascarar sinais iniciais de sepse, como também piorar a hipoperfusão já associada ao quadro (GUINN et al., 2007). Com isso, após o sexto mês de gestação, ocorre queda da hemoglobina e do hematócrito, constituindo a chamada “anemia fisiológica da gestação” (REZENDE; MONTENEGRO, 2003) que compromete a oferta de oxigênio aos tecidos. A hipoperfusão uterina e fetal decorrente deste fenômeno pode levar a acidose metabólica fetal (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005).

As modificações gravídicas nos componentes do sistema de coagulação objetivam assegurar o domínio das perdas hemorrágicas no sítio placentário. Estas ocorrem a partir do primeiro trimestre, concomitante à elevação do estrogênio e da progesterona, que são os possíveis elementos causais desta modificação (REZENDE; MONTENEGRO, 2003). O estado pró-trombótico gestacional eleva o risco de coagulação intravascular disseminado em pacientes com SRIS (CASTRO et al., 2008).

A enzima cicloxigenase (COX) é responsável pela conversão do ácido aracônico em intermediários de prostaglandina (SMITH; MURPHY, 2002; SMITH et al., 2000). A isoforma COX-1 é constitutiva e amplamente expressa na maioria dos tecidos enquanto que a COX-2 é indutiva agindo como um potente mediador inflamatório, já que o aumento da expressão dessa isoforma ocorre de maneira simultânea ao aumento de prostaglandinas e vários sistemas biológicos em resposta à estímulos inflamatórios (MURAKAMI et al., 2000; THOREN; JAKOBSSON, 2000; STICHTENOTH et al., 2001; MANCINI et al., 2001). Prostaglandinas, por sua vez, podem alterar a pressão arterial promovendo vasodilatação participando em doenças cardiovasculares bem como em complicações gestacionais (WALSH, 1985; MILLS et al., 1992; THOREN; JAKOBSSON, 2000).

A SIRS durante a gestação é um evento dramático e ainda de alta mortalidade, cuja fisiopatologia permanece em contínua investigação. As alterações fisiológicas da gestação podem mascarar ou mesmo agravar o quadro clínico da SRIS e, portanto, estudos são de fundamental importância para possibilitar o diagnóstico precoce, o qual é elemento crucial para o prognóstico materno e fetal (CASTRO et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Desde o surgimento da linha de estudos da Imunologia da Reprodução, quando Peter Medawar levantou o questionamento das razões pelas quais um feto semialogênico não é rejeitado pela mãe, os pesquisadores ficaram curiosos a respeito do papel do sistema imunológico durante a gestação. Atualmente se conhece a importância desse sistema não apenas no processo de imunotolerância, mas também em preparar o endométrio para a implantação do blastocisto, efetivar a manutenção da gestação por todo o período inclusive durante o parto, além de manter a proteção do organismo.

Dessa maneira, estudos em Imunologia da Reprodução são cruciais para determinar melhores métodos de tratamentos e diagnósticos em quadros clínicos como infertilidade, complicações obstétricas e demais problemas da saúde da mulher.

As células uNK representam a maior população de leucócitos decíduais durante a gestação e, portanto, merecem especial atenção, não apenas por sua abundância, mas também pelas importantes funções que desempenham.

O remodelamento adequado das artérias espiraladas mesometriais que ocorre durante o processo de placentação é um evento crucial para o sucesso gestacional que é mediado por moléculas vasoativas como o VEGF, angiotensina I/II, interferon-gama (IFN γ) e Óxido Nítrico (NO). Todas essas moléculas são produzidas pelas células uNK e, portanto, estas células são fundamentais para a gestação, levando à dilatação das artérias espiraladas decíduais e manutenção da integridade decidual, contribuindo para o desenvolvimento normal da decídua e da placenta.

A SRIS durante a gestação, apresenta implicações sociais e econômicas por ser um evento dramático e ainda de alta mortalidade, cuja fisiopatologia permanece em contínua investigação. As alterações fisiológicas da gestação podem mascarar ou até mesmo agravar seu quadro clínico e, portanto, estudos são de fundamental importância para possibilitar o diagnóstico precoce, o qual é elemento crucial para o prognóstico materno e fetal.

Portanto, a presente pesquisa vem contribuir na elucidação dos mecanismos da SRIS durante a gestação, do papel das células uNK nesse processo e a

participação da COX-2 nas respostas do organismo frente ao desafio inflamatório causado pela exposição do organismo ao LPS.

4 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar se a inflamação induzida pelo LPS é capaz de alterar a distribuição normal das células uNK DBA⁺ no útero gestante de camundongos (DG10) influenciando a remodelação das artérias espiraladas uterinas, enfatizando o envolvimento de COX-2 neste processo por meio do uso de inibidor seletivo, a Nimesulida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos propostos foram:

- a) confirmar a ocorrência do comportamento de ansiedade nos camundongos fêmeas gestantes após a administração de LPS e avaliar a participação da COX-2 nesse processo;
- b) realizar a caracterização morfológica das possíveis alterações nas células uNK DBA⁺ frente à exposição ao LPS;
- c) verificar se a administração de LPS é capaz de alterar a espessura das artérias que nutrem o embrião relacionando as possíveis alterações com os demais resultados;
- d) estimar se a administração prévia de inibidor de COX-2 (Nimesulida) é capaz de prevenir as alterações morfológicas e numéricas nas células uNK, bem como prevenir as alterações morfométricas nas artérias uterinas;

e) avaliar se o LPS é capaz de induzir a perda de perforina nos grânulos das células uNK, bem como alterar a marcação para α -actina no útero gestante de camundongos, e se esses eventos podem ser prevenidos com o pré-tratamento com Nimesulida;

f) analisar em todos os grupos experimentais parâmetros gestacionais tais como o tempo de gestação, número e peso dos filhotes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As informações específicas referentes aos animais utilizados, delineamento experimental, coleta de material, bem como a respeito dos testes e técnicas utilizadas estão discriminados a seguir.

5.1 ANIMAIS

Camundongos fêmeas SWISS (8-10 semanas de idade) foram acasaladas singenicamente e a detecção do plug vaginal determinou o primeiro dia gestacional (DG1). Todos os camundongos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Animal integrativa (LABAInt) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) em ambiente com ciclo de luz (ciclo claro/escuro de 12h/12h) e temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) controlados, bem como livre acesso a alimentação e água. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Unifal-MG (protocolo nº3692011).

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DE MATERIAL

Camundongos prenhes no DG10 receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de Salina ou Nimesulida (5mg/Kg). Trinta minutos após essa aplicação os animais receberam salina ou LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 026:B6; Sigma-Aldrich Co.) diluído em salina isotônica estéril (100µg/Kg), gerando, dessa forma, 4 grupos experimentais: LPS (LPS), Salina (Controle), Nimesulida+Salina (N) e Nimesulida+LPS (N+LPS).

Após 2h da segunda injeção (Salina ou LPS), todos os animais foram submetidos ao teste comportamental do Labirinto em Cruz Elevado ou eutanasiados para a coleta de material (n=10/grupo), conforme demonstrado no diagrama a seguir:

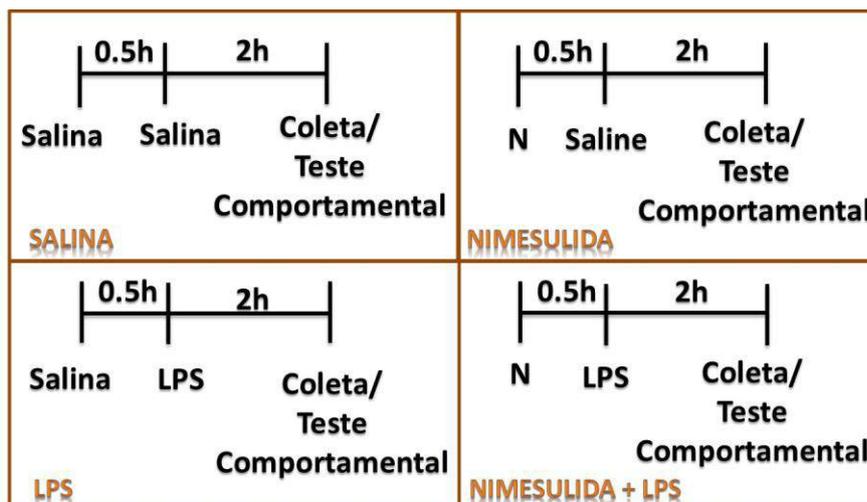


Figura 2 - Diagrama demonstrativo para o delineamento experimental dos grupos Salina, Nimesulida (N), LPS e Nimesulida+LPS (N+LPS); (n=10/grupo para coleta e n=10/grupo para estudo comportamental).

Fonte: Do autor.

Para a coleta de material os camundongos foram eutanasiados com anestésico (cloridrato de xilazina e ketamina) seguido de fixação por perfusão com paraformaldeído 4% em PBS (0,05M) com duração de 15 minutos utilizando 30mL da solução de fixação. Após a perfusão, os animais tiveram os cornos uterinos removidos, os sítios de implantação embrionária dissecados do útero e processados em parafina histológica. O tecido foi seccionado (7 μ m de espessura), montado em lâminas histológicas previamente revestidas com poly-L-lysina para o procedimento de histoquímica de lectina DBA, bem como para a técnica de imunohistoquímica para α -actina e perforina.

5.3 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste do labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado para analisar o estabelecimento do comportamento do tipo ansiedade em animais experimentais. O aparato possui dois braços abertos, dois braços fechados e uma plataforma central formando uma cruz suspensa como descrito na literatura (PELLOW; FILE 1986). Cada camundongo foi colocado individualmente no centro do aparato voltado para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. Os parâmetros comportamentais analisados foram frequência de entradas e tempo despendido

nos braços abertos e fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes ao braço aberto (entradas e tempo) caracterizam um comportamento do tipo ansiedade.

5.4 CITOQUÍMICA DE LECTINA DBA

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool e incubados com 1% em Tampão Fosfato Salina (PBS 50mM) de peróxido de hidrogênio por 30min. Logo após a lavagem com PBS 50mM, os cortes foram incubados com 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma, St Louis, USA) em PBS por 30 min, seguido de incubação com Lectina DBA biotinizada (#I9142. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em 1:300 em PBS/BSA a 1% por 12 hours a 4°C.

Após a lavagem com PBS, os cortes foram incubados com streptavidina-peroxidase (Chemicon International, Temecula, CA, USA; 1 hora a temperatura ambiente) e revelados com 3,3 diaminobenzidina (#D12384. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em TBS (50mM) contendo peróxido de hidrogênio a 0.1%. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, montadas com Entellan (Merck kGAa 64271 #HX378130 Darmstadt, Alemanha) e observadas em microscópio de luz (Níkon Eclipse 80i, Tokyo, Japão). Cortes para controle negativo foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, a incubação com Lectina DBA continha N-acetil-galactosamina 1% (açúcar específica ao qual a Lectina DBA se liga).

5.5 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

Dos cortes submetidos à histoquímica de Lectina DBA, três cortes de três sítios de implantação embrionária diferentes de 5 animais de cada grupo experimental foram usados para o estudo estereológico. Esse estudo revelou a densidade dos perfis (quantidade dos 4 subtipos de células uNK DBA⁺) nas três

regiões do sítio de implantação (Figura 3) por área teste (AT) de $40000\mu\text{m}^2$ como descrito anteriormente (PAFFARO Jr et al., 2003; ZAVAN et al., 2012). A área teste foi delimitada por um sistema de teste quadrático com 2 linhas de exclusão e apenas as células com núcleo visível foram quantificadas.

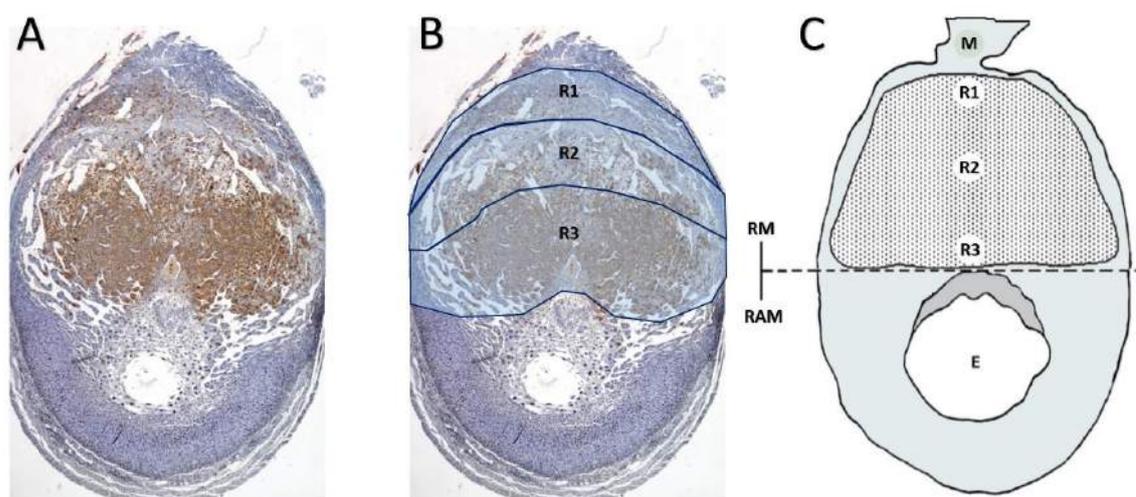


Figura 3 - Corte histológico de sítio de implantação no GD10 (A) após marcação com Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris. Mesmo corte histológico (B) contendo a demarcação das Regiões 1 (R1), 2 (R2) e 3 (R3). Diagrama de linhas representativo de um sítio de implantação no GD10 (C) indicando as regiões R1, R2 e R3 na região mesometrial (RM) onde são encontradas as células uNK. M= Miométrio; RAM= Região Anti-Mesometrial; E=Embrião.

Fonte: Do autor.

5.6 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA α -ACTINA e PERFORINA

As reações de imunohistoquímica para α -actina e perforina foram realizadas após os cortes histológicos serem desparafinizados em xilol, hidratados em gradiente decrescente de álcool e incubados com 1% de peróxido de hidrogênio (#216763. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS por 30min. Logo após a lavagem com PBS (50mM), os cortes foram incubados com 1% de albumina sérica bovina (BSA - #05470. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS por 30 min, seguido de incubação (over night – 4°C) com o anticorpo primário: anti- α -actina 1:100 (#A2103. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ou anti-perforina 1:50 (#AV42208. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após lavagem com PBS os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário: anti-coelho biotinilado a

1:500 (#B8895. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 1 hora e streptavidina-peroxidase 1:150 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) por mais 1 hora (Sigma Chemical co. USA). Após lavagem com PBS, os cortes foram revelados com 3,3 diaminobenzidina (Sigma, St Louis, USA) em TBS 50mM contendo peróxido de hidrogênio 0,1%. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, montados em Entellan (Merck kGAa 64271 #HX378130 Darmstadt, Alemanha) e observados com microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japão). Cortes histológicos para controle negativo da reação foram obtidos com procedimento similar, porém omitindo o anticorpo primário.

5.7 QUANTIDADE DA NINHADA E ANÁLISE DAS ARTÉRIAS UTERINAS

Cinco animais de cada grupo experimental foram mantidos até o termo com ração e água *ad libidum*. Após o nascimento, foi analisado o peso dos filhotes e o tamanho da ninhada, além de ser procedida a análise macroscópica da qualidade da prole. Para a análise da parede arterial e diâmetro do lúmen foi realizada a coloração rotineira de Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) em 10 lâminas histológicas do sítio de implantação embrionária de cada grupo experimental e observadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse 80i/Japão) utilizando software de análise de imagem NIS-Elements/Nikon/Japão). A área total (AT) e a área da luz do vaso (AL) das artérias foram mensuradas e a diferença entre AT e AL representa espessura das artérias.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA) seguida do teste de comparação das médias de Scott-Knott. Quando os pressupostos de normalidade e de homocedasticidade não foram satisfeitos, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

6 RESULTADOS

A metodologia aplicada propiciou a obtenção de diversos resultados que elucidaram os processos ocorridos na SRIS durante a gestação, com o envolvimento da COX-2 em muitos desses eventos. Os resultados obtidos se encontram descritos a seguir.

6.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ASSOCIADO À ANSIEDADE

Para verificar a efetividade da administração do LPS, foi feita a análise comportamental de ansiedade utilizando o labirinto em cruz elevado. Como demonstrado na figura 4, não houve diferença relacionada ao tempo gasto nos braços abertos ($p=0,1272$) e braços fechados ($p=0,0645$) entre o grupo que recebeu salina (34,36s e 207,50s respectivamente) e o grupo que recebeu apenas nimesulida (39,39s e 188,09s respectivamente). O tratamento com LPS causou o estabelecimento do comportamento do tipo ansiedade onde as fêmeas apresentaram menor tempo de permanência nos braços abertos (9,95s) comparado com o controle (34,36s, $p<0,0001$; Figura 4A), e apresentaram maior tempo de exploração dos braços fechados (260,88s) contra o grupo controle (207,50s, $p<0,0001$; Figura 4B).

O pré-tratamento com Nimesulida não foi capaz de impedir o estabelecimento do comportamento do tipo ansiedade uma vez que não houve diferença no tempo gasto nos braços abertos ($p=0,1668$; Figura 4A) e braços fechados ($p=0,0558$; Figura 4B) entre LPS (9,95s e 260,88s respectivamente) e o grupo Nimesulida+LPS (14,28s e 248,32s respectivamente).

Foi observado um decréscimo na capacidade exploratória do animal no grupo tratado com LPS, pois a frequência de entrada nos braços abertos e fechados ($p<0,0001$, Figuras 4C e 4D) no grupo tratado com LPS (1,93 e 2,70 respectivamente) foi menor do que a observada no grupo controle (11,25 e 11,22 respectivamente). A alteração desse parâmetro observada no grupo LPS não pode ser evitada pelo pré-tratamento com Nimesulida (3,75 e 4,80 respectivamente)

apresentando frequência ainda menor em comparação com o controle (11,25 e 11,22 respectivamente, $p < 0,0001$).

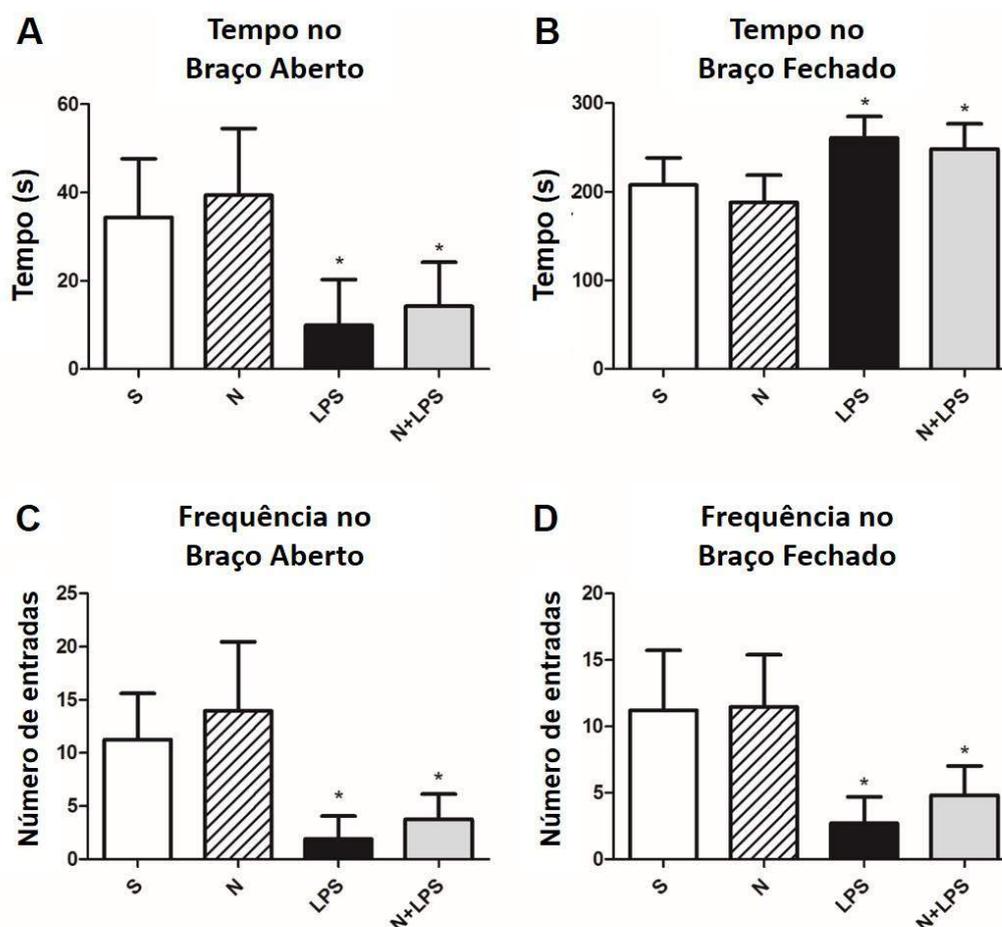


Figura 4 - Teste do labirinto em cruz elevado para análise de parâmetros relacionados à ansiedade, tais como tempo de permanência no braço aberto (A) e fechado (B) e frequência de entrada nos braços abertos (C) e fechados (D). (S= Salina, N= Nimesulida, LPS, N+LPS= Nimesulida+LPS).

Fonte: Do autor.

6.2 MORFOLOGIA DAS CÉLULAS UNK DBA⁺

A técnica de histoquímica de lectina DBA possibilitou a identificação das células uNK DBA⁺, sendo que, nos cortes histológicos dos sítios de implantação embrionária dos camundongos tratados com LPS foi notado na região mesometrial um aumento no número de células uNK DBA⁺ bem como a presença de vasos sanguíneos dilatados (Figura 5B; dados quantitativos mostrados nas figuras 6 e 8

para células uNK e vaso sanguíneo respectivamente) quando comparado com os camundongos tratados com salina (Figura 5A).

As células uNK DBA⁺ estavam bem distribuídas na região da decídua basal e MLAp (Agregado Linfoide Mesometrial da Prenhez) de cada sítio de implantação embrionária de cada grupo experimental. Essa distribuição estava de acordo com o descrito na literatura por Paffaro Jr et al. (2003) e Zavan et al. (2010). Da mesma maneira foi possível a identificação dos quatro subtipos das células uNK DBA⁺ descritos por esses autores, ou seja, a uNK do Subtipo 1, pequena e sem grânulos; do subtipo 2, com diâmetro maior e poucos grânulos citoplasmáticos; do subtipo 3 com núcleo onde predominava a eucromatina, nucléolo evidente, tamanho maior e muitos grânulos e do subtipo 4, célula apresentando extensas áreas de extração citoplasmática semelhantes à células em senescência (Figura 5C-5F). As células uNK dos animais tratados com LPS apresentavam alterações morfológicas relacionadas à reatividade com a lectina DBA como demonstrado na figura 5G, e a dificuldade em classifica-las utilizando os padrões normais já descritos na literatura nos levou a classifica-las como células uNK alteradas (alt-uNK).

As células alt-uNK DBA⁺ apresentavam descontinuidade na reatividade à lectina DBA em sua superfície e/ou grânulos reativos apenas em seus contornos e/ou ausência completa da reatividade nos mesmos.

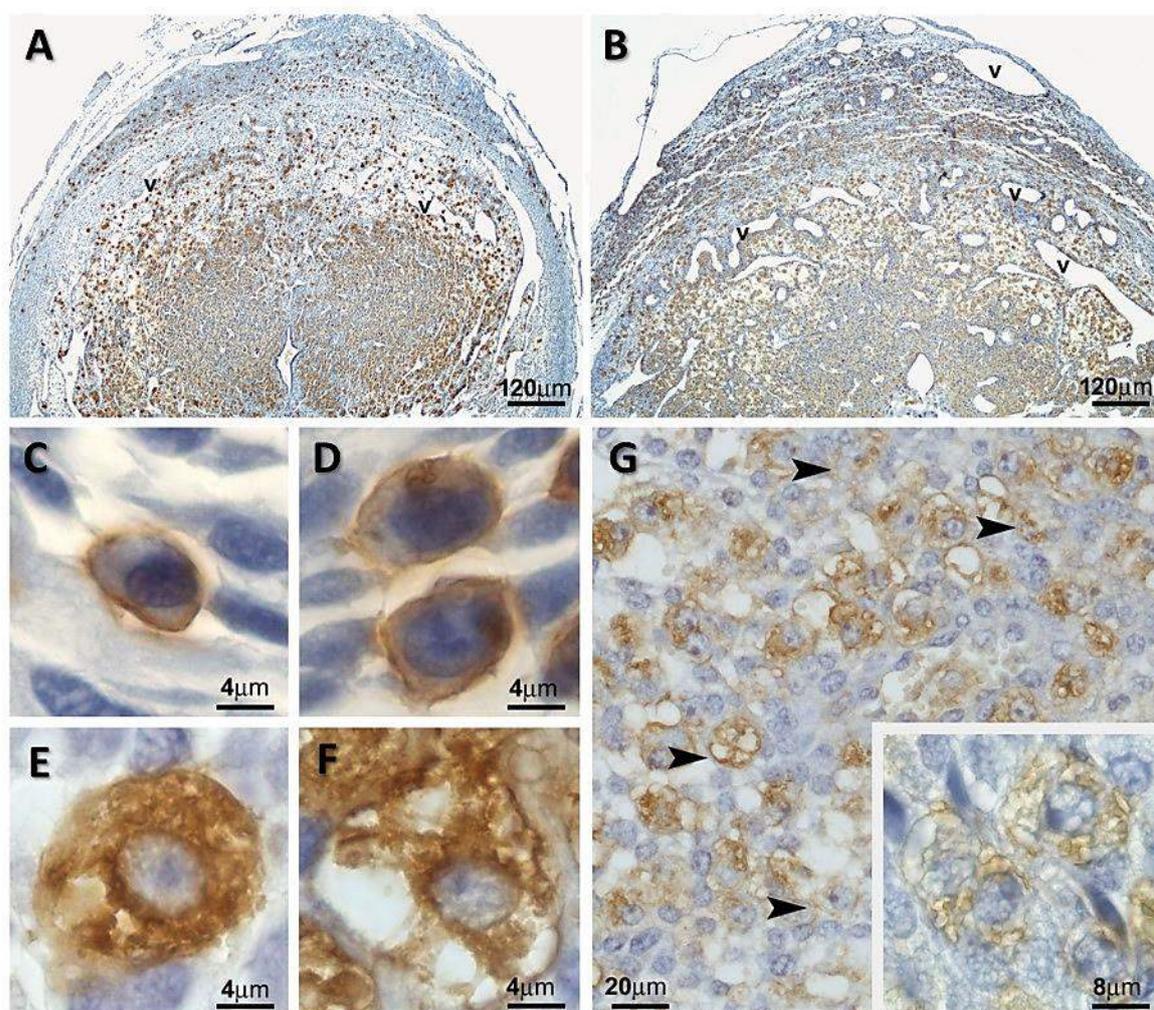


Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no DG10 após citoquímica de Lectina DBA. Região mesometrial do sítio de implantação de camundongos normais (A) e após tratamento com LPS (B). Quatro subtipos das células uNK DBA⁺ (C-F), células uNK alteradas do grupo LPS (G – cabeça de setas; detalhe em maior aumento). Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris. V= Vaso Sanguíneo.

Fonte: Do autor.

6.3 ANÁLISE ESTEREOLÓGICAS DAS CÉLULAS UNK DBA⁺

Para avaliar a distribuição das células uNK DBA⁺ nos sítios de implantação embrionária (DG10) dos animais de cada grupo experimental, foi realizada a análise estereológica obtendo a densidade dos subtipos de células uNK DBA⁺ como descrito anteriormente por Paffaro Jr et al. (2003) e Zavan et al. (2012), porém incluindo a quantificação das células uNK alteradas descritas nesse

trabalho. A distribuição dessas células em cada uma das três regiões (Figura 1) está representada nas figuras 6 e 7.

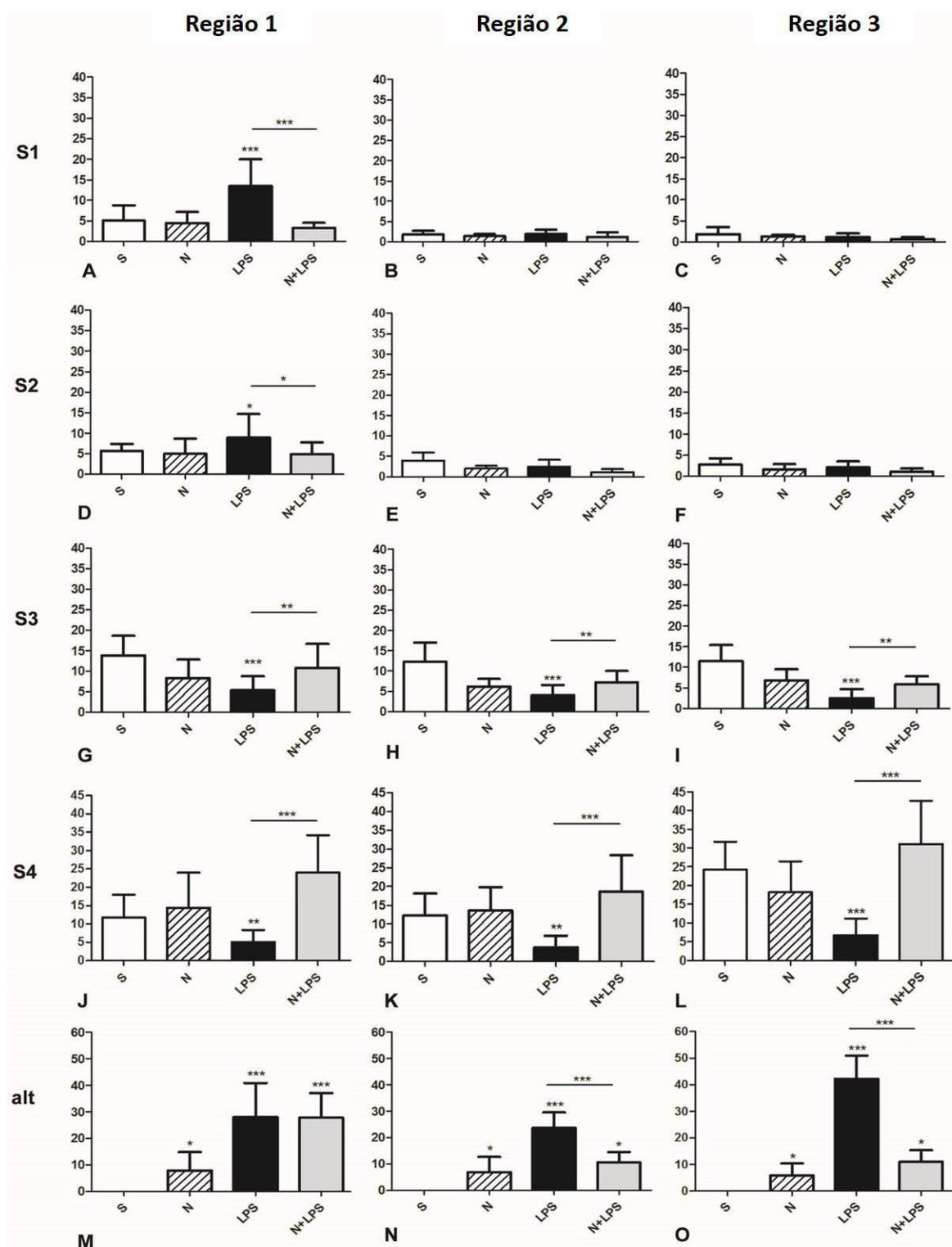


Figura 6 - Quantificação dos 4 subtipos de células uNK DBA⁺ (S1-4) e das células alteradas (alt) em cada uma das 3 regiões do sítio de implantação embrionária de camundongos prenhes no DG10 em cada um dos grupos experimentais: Salina (S), Nimesulida (N), LPS e Nimesulida+LPS (N+LPS).

Fonte: Do autor.

Na região 1, o subtipo 1 das células uNK DBA⁺ (Figura 6A) foi encontrado na frequência de 5,05 células/AT no grupo controle. O grupo que recebeu apenas Nimesulida apresentou resultado similar com 4,46 células/AT ($p=0.6632$), entretanto foi encontrado um número significativamente maior dessas células (13,44 células/AT) no grupo tratado com LPS ($p=0.0002$). O pré-tratamento com Nimesulida bloqueou o aumento em número (3,33 células/AT) causado pelo LPS ($P<0.0001$). Nenhuma diferença no número de células do subtipo1 foi encontrada nas regiões 2 e 3 do sítio de implantação ao comparar todos os grupos experimentais. (Figura 6B e 6C).

Na região 1, a distribuição do subtipo 2 das células uNK DBA⁺ (Figura 6D) aumentou ($p=0.0465$) após a administração de LPS (8,91 células/AT) comparando com o grupo Salina (5,67 células/AT), e esse aumento foi prevenido pelo pré-tratamento com Nimesulida (4,89 células/AT, $p=0,0133$). Não houve diferença no número de células uNK DBA⁺ do subtipo 2 nas regiões 2 e 3 (Figura 6E e 6F).

Houve uma diminuição ($p=0,0014$) no número de células uNK DBA⁺ do subtipo 3 na região 1 (Figura 6G) no grupo tratado com LPS (5,33 células/AT) comparando com o grupo Salina (13,86 células/AT). Esse evento pôde ser prevenido ($p=0,0046$) com o pré-tratamento de Nimesulida (10,84 células/AT). O mesmo padrão foi observado nas regiões 2 e 3 (Figura 6H e 6I), onde o número de células do subtipo 3 foi maior ($p<0,0001$ e $p<0,0001$ respectivamente) no grupo controle (6,21 e 6,80 células/AT respectivamente) comparado com o grupo LPS (3,99 e 2,48 células/AT respectivamente). A redução no número de células desse subtipo no grupo LPS foi bloqueada ($p=0,0013$ e $p<0,0001$ respectivamente) pelo pré-tratamento com Nimesulida (7,23 e 5,80 células/AT respectivamente).

O subtipo 4 das células uNK DBA⁺ (Figura 6J – 6L) diminuiu em número no grupo tratado com LPS nas regiões 1, 2 e 3 (5,07; 3,69 e 6,71 células/AT respectivamente) comparando ($p=0,0047$; $p=0,0002$ e $p<0,0001$ respectivamente) com o grupo controle (14,40; 13,50 e 18,21 células/AT respectivamente).

O pré-tratamento com Nimesulida preveniu o decréscimo no número de células uNK DBA⁺ do subtipo 4 em todas as regiões (23,94; 18,64 e 31,01 células/AT respectivamente) comparando com o grupo LPS ($p<0,0001$ para todas as regiões).

Como demonstrado na figura 6, não houve diferença relacionando todos os subtipos de todas as regiões em os grupos que receberam apenas o nimesulida e o

grupo salina, exceto pela presença de poucas células uNK DBA⁺ alteradas no grupo nimesulida (Figura 6M-O).

Um número substancial de células uNK DBA⁺ alteradas pôde ser observado em todas as regiões (Figura 6M-O) após o tratamento com LPS. Na região 1 o abundante número de células alteradas (27,95 células/AT) no grupo LPS não pôde ser prevenido pelo pré-tratamento com Nimesulida (27,83 células/AT, $p=0,4816$). Entretanto, nas regiões 2 e 3 o pré-tratamento foi efetivo, reduzindo o número de células alteradas de 63,64 e 42,23 células/AT para 10,53 e 10,98 células/AT ($p<0,0001$; para as duas regiões).

Com a análise morfológica do sítio de implantação embrionária foi possível evidenciar o constatado na morfometria, sendo esta análise representada na figura 7 demonstrando a distribuição e morfologia normal das células uNK DBA⁺ nas três regiões (Figura 7A, 7B e 7C, respectivamente) estudadas. Também na figura 7 foi possível observar a alteração na marcação para lectina DBA nas células uNK após 2h da aplicação do LPS nas três regiões estudadas (Figura 7D, 7E e 7F, respectivamente). O bloqueio prévio da COX-2 à aplicação do LPS resultou na ocorrência de células uNK DBA⁺ semelhantes ao observado no grupo controle.

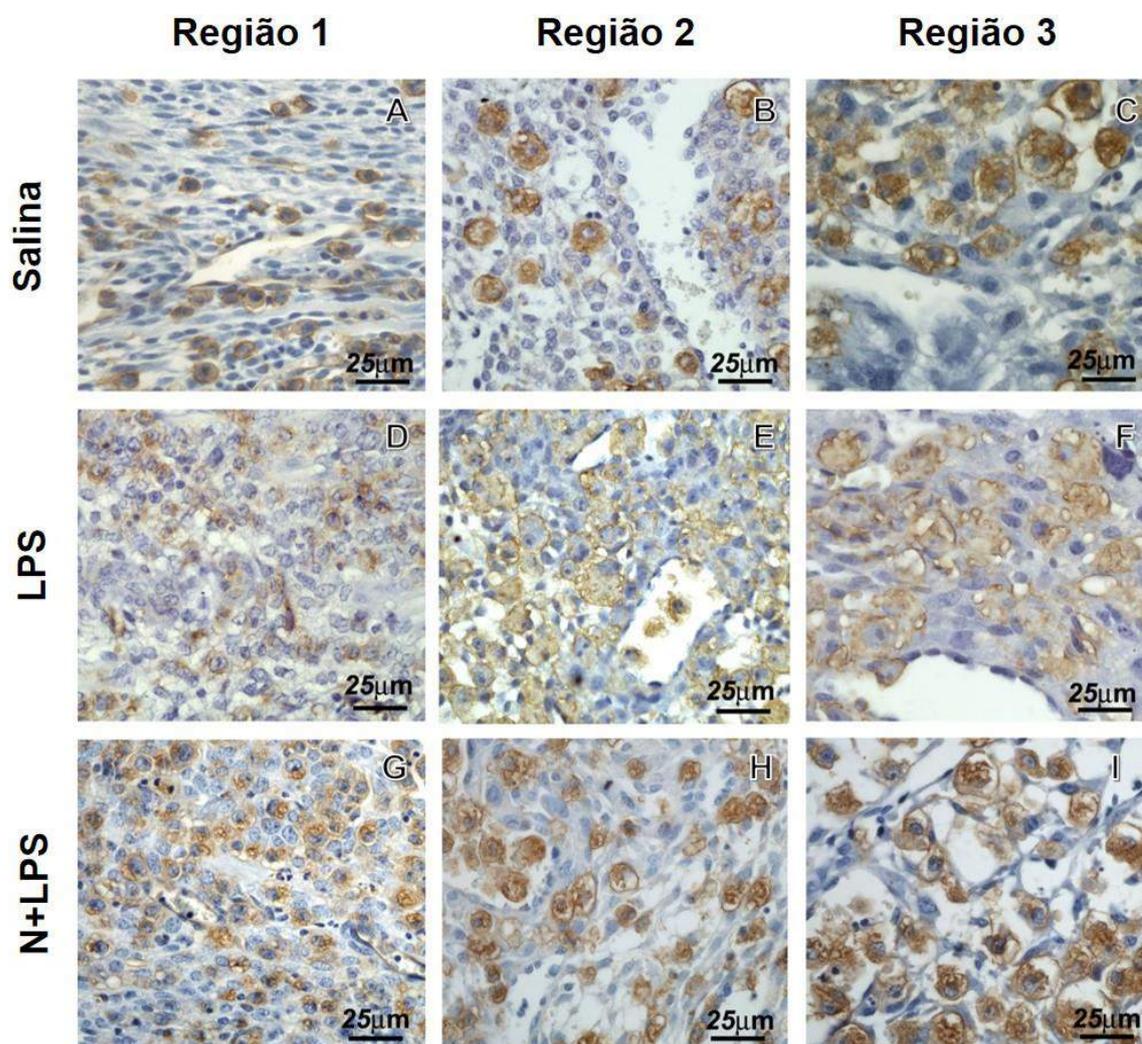


Figura 7 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no DG10 após citoquímica de Lectina DBA nas 3 regiões estudadas para os grupos tratados com Salina, LPS e Nimesulida+LPS (N+LPS). Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

6.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS ARTÉRIAS UTERINAS E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA α -ACTINA

Para a análise morfométrica das artérias uterinas, foi mensurada a área total (AT= parede do vaso + área luminal) e área luminal (AL) das artérias mesometriais sendo que a diferença entre AT e AL representa a espessura da parede arterial. Como demonstrado na figura 8, não houve diferença ($p=0,1516$) entre os grupos de animais que receberam salina ($4483,3 \mu^2$) e apenas nimesulida ($3923,12 \mu^2$). Entretanto, o grupo que recebeu LPS apresentou parede arterial mais fina ($2193,4 \mu^2$) comparado com o controle ($p<0,0001$). O pré-tratamento com nimesulida apresentou paredes arteriais com espessura ($5360,81 \mu^2$) similar ao grupo controle ($p=0,3572$).

Foi observada reação positiva para α -actina no miométrio e nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos do miométrio e endométrio no grupo controle (Figura 8B). Foi observada fraca reação positiva para α -actina no grupo tratado com LPS (Figura 8D), em especial nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos do endométrio. O grupo pré-tratado com Nimesulida apresentou reação positiva para α -actina no miométrio e nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos do miométrio e endométrio (Figura 8F) semelhante ao observado no grupo controle. As reações de controle negativo para α -actina referente a cada grupo experimental estão demonstradas nas figuras 8C, 8E e 8G respectivamente.

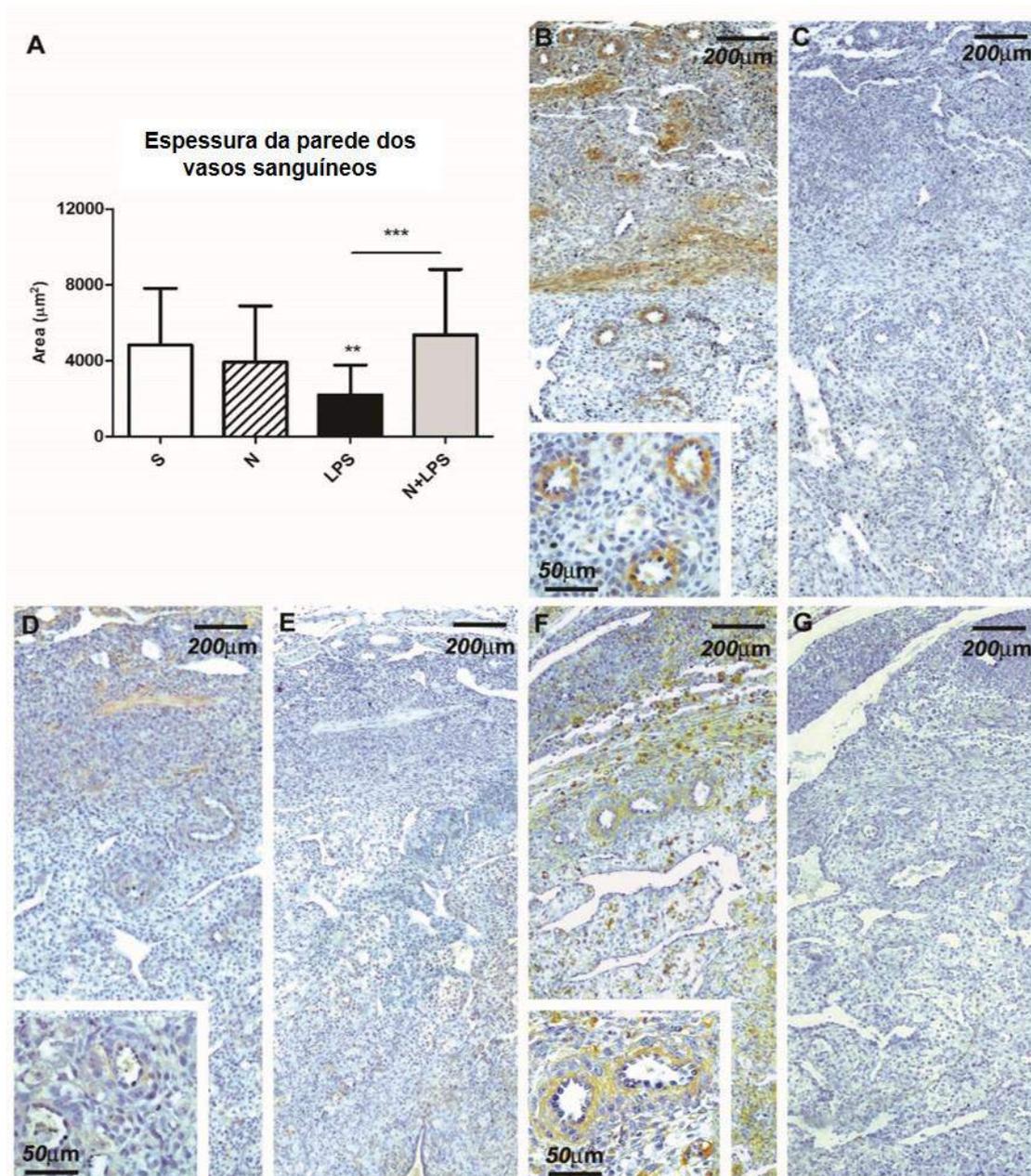


Figura 8 - Análise morfométrica da espessura das artérias uterinas dos animais dos grupos experimentais (A). Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no DG10 após imunohistoquímica para α -actina: grupo controle (B) reação positiva nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (detalhe); controle negativo da reação para o grupo controle (C); grupo tratado com LPS (D) fraca reação nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (detalhe); controle negativo da reação para o grupo LPS (E); grupo tratado com Nimesulida+LPS (F) reação nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos (detalhe); controle negativo da reação para o grupo Nimesulida+LPS (G). Imunohistoquímica para α -actina-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor

O baixo valor encontrado na razão entre AT e AL nas artérias mesometriais de animais tratados com LPS é um indicativo não apenas de que a espessura do

vaso esteja reduzida, como também de que as artérias desses animais estejam dilatadas, conforme demonstrado na Figura 9.

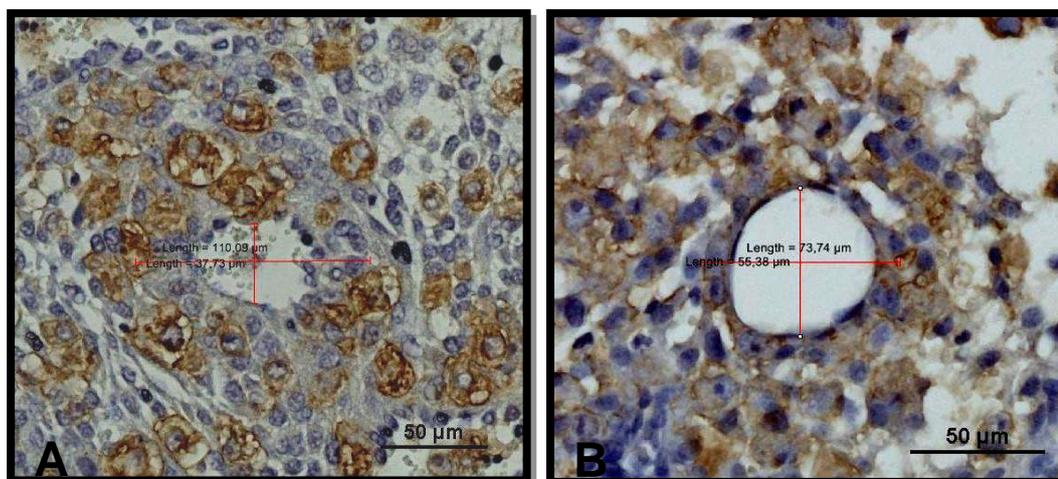


Figura 9 - Método de morfometria das artérias uterinas de sítios de implantação. Artéria endometrial de camundongo do grupo controle e células uNK (coloração castanho) com morfologia normal (A). Grupo LPS com espessura reduzida das artérias, aumento do diâmetro do lúmen e células uNK alteradas (B). Lectina DBA/DAB-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

6.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PERFORINA

A imunohistoquímica para perforina foi positiva nos cortes histológicos do sítio de implantação embrionária do grupo salina (Figura 10B; controle negativo na Figura 10A). A reação específica e bem localizada pôde ser observada nos grânulos citoplasmáticos das células uNK DBA⁺ representada na figura 10C. Entretanto, não foi possível observar reação positiva no grupo tratado com LPS (Figura 10D) com reação difusa e inespecífica nos grânulos citoplasmáticos das células uNK (Figura 10E). O grupo pré-tratado com nimesulida apresentou reação específica para perforina semelhante ao observado no grupo controle (Figura 10G; controle negativo na Figura 10F), com detalhes da marcação nos grânulos demonstrado na figura 10H.

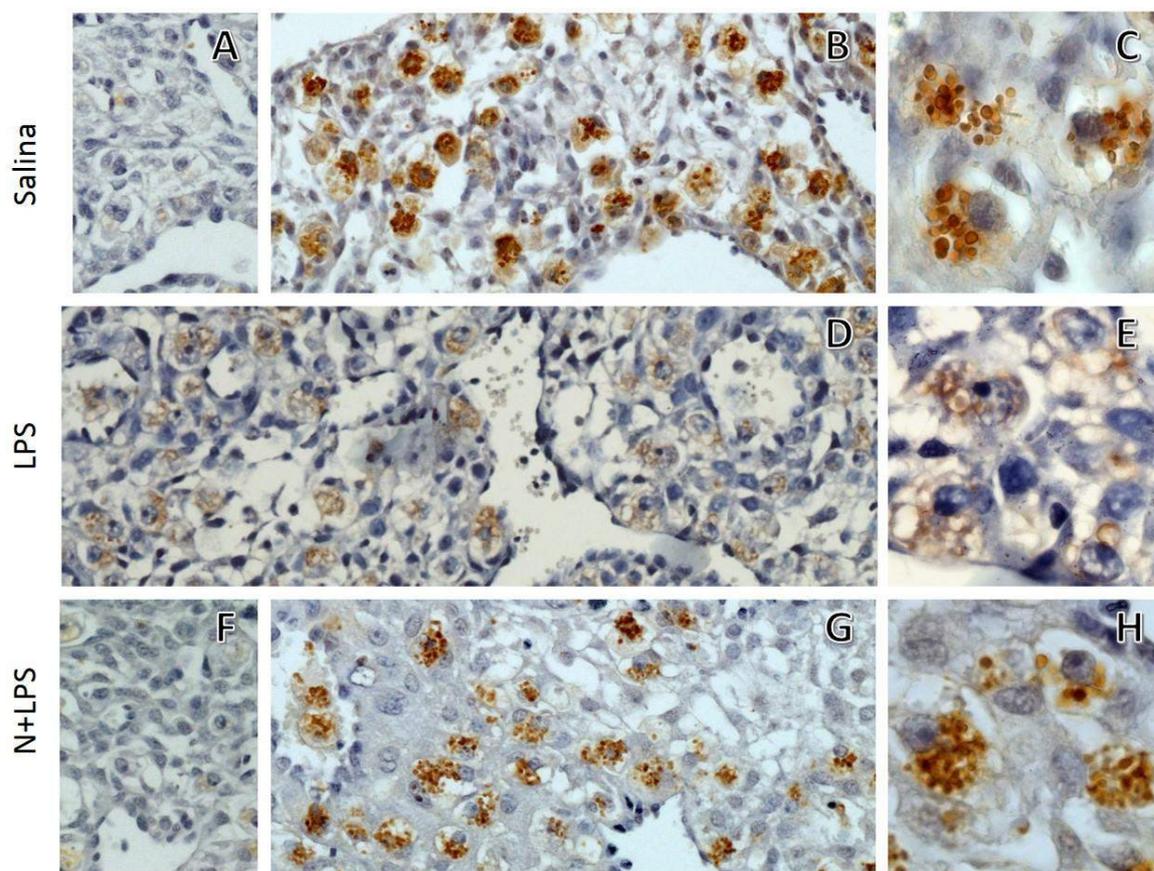


Figura 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no DG10 após imunohistoquímica para perforina: controle negativo da reação (A), reação positiva para perforina nas células uNK do grupo salina (B) e detalhe da marcação específica nos grânulos citoplasmáticos das células uNK (C). Reação para perforina nos cortes histológicos do grupo tratado com LPS (D) e detalhe da reatividade nos grânulos (E). Controle negativo da reação para o grupo pré-tratado com nimesulida (F); Reação positiva no grupo pré-tratado com nimesulida (G) e detalhe da marcação específica nos grânulos (H). Imunohistoquímica para perforina-Peroxidase/hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor

6.6 TAMANHO E PESO DA PROLE

Considerando as alterações morfofisiológicas que ocorrem no útero durante período mediano da gestação após a exposição ao LPS, faz-se imprescindível avaliar a quantidade e qualidade da prole. Como demonstrado na figura 11, houve um decréscimo ($p=0,0002$) no número de filhotes nascidos de fêmeas que receberam LPS (3,6 filhotes) comparado com o grupo que recebeu apenas salina (13 filhotes). O pré-tratamento com nimesulida não foi capaz de reverter o efeito do

LPS apresentando uma média da quantidade de filhotes ainda menor (0,6 filhotes). Não houve diferença na média do peso dos filhotes em todos os grupos experimentais exceto no grupo Nimesulida+LPS (2,104g) sendo este maior do que o observado no grupo controle (1,846, $p=0,0027$).

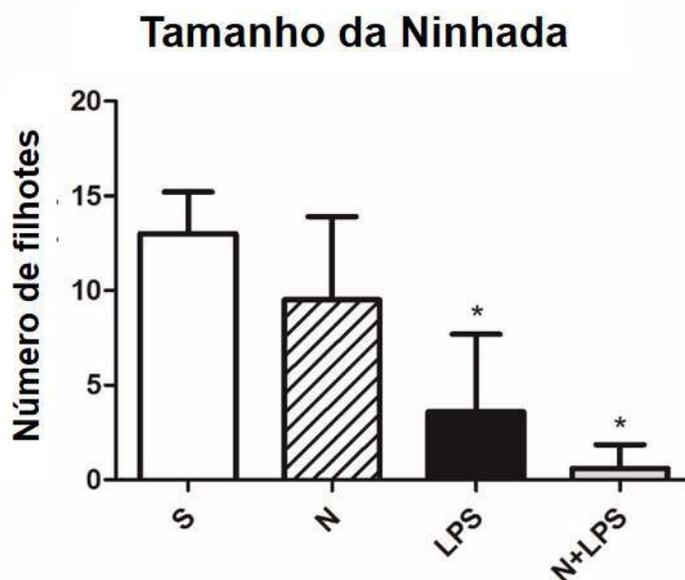


Figura 11 - Gráfico representativo do número médio de filhotes por animal dos quatro grupos experimentais (S= Salina, N= Nimesulida, LPS, N+LPS= Nimesulida+LPS).

Fonte: Do autor.

7 DISCUSSÃO

O LPS é conhecido por estabelecer no organismo hospedeiro um grupo de alterações comportamentais denominado de comportamento doentio (DANTZER et al. 2008, HENRY et al. 2008, BASSI et al. 2012).

Para verificar se a administração de LPS foi eficaz em causar alterações comportamentais, foi realizada a análise de parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade. Como esperado, o LPS teve efeito ansiogênico corroborando aos achados de outros autores na literatura (DANTZER et al., 2008; HENRY et al., 2008; BASSI et al., 2012). Mas no presente estudo, pela primeira vez, foi demonstrado que a inflamação sistêmica causada por administração de LPS de *E. coli* apresenta o mesmo efeito em camundongos no período mediado da gestação (DG10). No presente estudo, a inibição da COX-2 não pode evitar o estabelecimento de comportamento semelhantes a ansiedade nos camundongos; portanto, o estabelecimento desse comportamento parece ser mediado por citocinas pró-inflamatórias ou via COX-1. Como sugerido por Teeling e colaboradores (2010), o LPS induziu alterações comportamentais em ratos normais saudáveis por ativação da COX-1, e não da COX-2, mas uma melhor compreensão das vias biológicas através das quais a inflamação sistêmica influencia as funções cerebrais, tanto em situações normais como em patologias, pode favorecer ao melhoramento ou desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (TEELING et al., 2010).

As células uNK DBA⁺ puderam ser identificadas pela histoquímica de Lectina DBA como descrito anteriormente por Paffaro Jr e colaboradores (2003) e demonstrado no presente trabalho. A distribuição dessas células na região do MLAp foi observada em todos sítios de implantação de cada grupo experimental, sendo que esta distribuição está de acordo com o descrito na literatura (PAFFARO Jr et al., 2003; ZAVAN et al., 2010), o que sugere que o estímulo com LPS não provoca distribuição ectópica dessas células no sítios de implantação embrionária, porém, de acordo com a morfologia descrita nesse trabalho, o número de células uNK DBA⁺ se encontra aumentado, principalmente na região de influxo celular (Região 1) dos sítios de implantação de animais tratados com LPS.

É plausível supor que o estímulo inflamatório possa provocar influxo de células uNK para ambiente uterino, uma vez que o LPS induz a expressão de várias quimiocinas em macrófagos (KOPYDLOWSKI et al., 1999). Estas células, por sua vez, são bastante populosas no útero gestante podendo então estar envolvidas nesse processo (BRANDON, 1995; STEWART; MITCHELL, 1991). Outras células que podem estar envolvidas são as células dendríticas uterinas, que também respondem a estímulos de moléculas derivadas de microrganismos, como por exemplo o LPS ou à mediadores inflamatórios como o TNF α (ERLEBACHER, 2014).

Foi possível notar que os vasos sanguíneos se encontram dilatados no grupo experimental que recebeu injeção de LPS. É de conhecimento que o LPS promove o processo de vasodilatação, alterando a contração da musculatura lisa ao redor do vaso pelo aumento da expressão de Óxido Nítrico sintase (NOS) e prostaglandinas (SCHILDKNECHT et al., 2004). Além disso, células musculares lisas dos vasos sanguíneos expressam TLR4 e CD14, sendo capazes de sinalizar em resposta à até mesmo pouca quantidade de LPS no sangue circulante, resultando em diminuição da expressão de genes cujo produto está relacionado com a contração, como, por exemplo, o da α -actina levando à vasodilatação (SANDBO et al., 2007). Além disso, as prostaglandinas, que se encontram em níveis elevados em situação de inflamação, por si só são capazes de promover vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular (FUNK, 2001).

A reação para lectina DBA também possibilitou a identificação dos 4 subtipos das células uNK DBA⁺ como descrito na literatura (PAFFARO Jr et al., 2003; ZAVAN et al., 2010), porém, o presente trabalho demonstra que a administração de LPS causou alterações morfológicas das células uNK, bem como, no padrão de marcação da lectina DBA, e a dificuldade em classifica-las utilizando os padrões normais já descritos na literatura nos levou a classifica-las como células uNK alteradas (alt-uNK).

Essas alterações consistiram em descontinuidade da reatividade para DBA em suas superfícies e/ou ausência de reatividade para DBA em seus grânulos ou nos contornos dos mesmos o que lhes conferia o aspecto de estarem vazios. Tais alterações corroboram às descritas por Lippe (2007) avaliando o efeito do LPS após 6h, bem como às descritas por Roman (2001) em modelo de lesão embrionária em camundongos, e também por trabalhos anteriores do nosso grupo

de pesquisa (ZAVAN, 2011; SALLES, 2014). Estes estudos demonstraram que as células uNK respondem às alterações homeostáticas uterinas, sendo possível, inclusive, de serem utilizadas como método de diagnóstico histológico empregado na pesquisa em biologia da reprodução, identificando complicações gestacionais em modelo de camundongos prenhes.

Durante uma resposta inflamatória, a produção de prostaglandina aumenta drasticamente, muitas vezes estimulada pela ação da COX-2, como, por exemplo, o que ocorre em modelos de inflamação induzida por LPS (TILLEY et al., 2001; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). E esse evento precede o recrutamento de leucócitos e o influxo de células imunológicas (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A análise estereológica dos subtipos das células uNK DBA⁺ revelou que a resposta dessas células após o estímulo do LPS é dependente de sua localização. Neste trabalho foi demonstrado que o desafio inflamatório promovido pela injeção de LPS causou um aumento do número de células uNK imaturas no ambiente uterino, o qual ocorreu de maneira expressiva na região 1 dos sítios de implantação. A região 1 é amplamente caracterizada na literatura como a área onde ocorre influxo de células precursoras das uNK durante uma gestação normal (PAFFARO Jr et al., 2003, ZAVAN et al., 2010). Dessa maneira postulamos que a inflamação induzida pode mobilizar células imunológicas de tal maneira que aumenta o influxo de células uNK imaturas para o ambiente uterino.

Como citado anteriormente, a inflamação tem como consequência a vasodilatação, causada, entre outros fatores, pelo aumento dos níveis de prostaglandinas que promovem o aumento da permeabilidade vascular, facilitando o influxo de células imunológicas (FUNK, 2001). Dessa maneira, o pré-tratamento com Nimesulida, que bloqueia COX-2 reduzindo a produção de prostaglandinas, foi eficaz em prevenir o processo de influxo de células uNK DBA⁺ do subtipo 1 para os sítios de implantação embrionária.

Os resultados estereológicos referentes à região 2 mostram que, nessa região, não ocorreu o aumento de células uNK DBA⁺ imaturas (subtipos 1 e 2). Sendo esta região caracterizada na literatura por ser um local de proliferação dessas células (PAFFARO Jr et al., 2003, ZAVAN et al., 2010), os resultados do presente trabalho sugerem que o LPS provoca influxo de células uNK DBA⁺ na região 1, porém não provoca aumento da proliferação dessas células. Entretanto,

estudos utilizando marcadores específicos para proliferação celular devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

A análise quantitativa das células uNK DBA⁺ após 2h da aplicação do LPS, demonstra que os subtipos mais diferenciados (subtipo 3 e 4) se encontram reduzidos. Ao mesmo tempo, pode ser notado um aumento no número de células uNK DBA⁺ alteradas, sugerindo que os subtipos mais responsivos ao desafio inflamatório induzido pelo LPS sejam os subtipos 3 e 4, que mudam sua morfologia e expressão do açúcar N-acetil-D-Galactosamina, talvez como um reflexo da alteração funcional dessas células. Mais do que isso, a análise quantitativa desses dois subtipos de células uNK sugere que essa alteração morfofuncional seja mediada por COX-2, uma vez que esse evento pôde ser prevenido pelo pré-tratamento com Nimesulida.

O efeito preventivo às alterações morfológicas frente ao LPS pelo inibidor de COX-2 também pode ser evidenciado no presente trabalho, uma vez que as células uNK DBA⁺ observadas nas 3 regiões do sítio de implantação do grupo Nimesulida+LPS apresentam morfologia semelhante à observada no grupo que recebeu apenas salina e diferente da observada no grupo que recebeu LPS.

O remodelamento das artérias espiraladas uterinas é considerado necessário para ampliar o fornecimento de nutrientes do sangue materno para a placenta dando suporte ao feto em desenvolvimento e em rápido crescimento (RATSEP et al., 2015). As células uNK exercem funções cruciais no processo de angiogênese e remodelamento das artérias espiraladas uterinas e, posteriormente, na abertura da circulação útero-placentária (LEONARD et al., 2013; RATSEP et al., 2015). Dessa maneira, alterações morfofuncionais nas uNK podem ter consequências nos vasos sanguíneos do útero gestante.

O estudo morfométrico das artérias uterinas revelou que a espessura da parede desses vasos sanguíneos estava menor no grupo tratado com LPS e, ao mesmo tempo, o lúmen estava dilatado. Mais uma vez, os aspectos relacionados à vasodilatação, possivelmente causada tanto pelas alterações nas células uNK, quanto pela maior produção de NO, bem como pelo aumento dos níveis de prostaglandinas (FUNK, 2001; SCHILDKNECHT et al., 2004), parecem ser prevenidos pelo pré-tratamento com Nimesulida.

A imunohistoquímica para α -actina do presente trabalho deu suporte aos achados da morfometria vascular supracitada, pois houve diminuição da

reatividade de α -actina após 2h do tratamento com LPS. O mesmo não foi observado no grupo pré-tratado com inibidor de COX-2.

Estudos de Hazan et al. (2010) demonstraram que a redução da musculatura lisa dos vasos sanguíneos é um fenômeno natural do remodelamento vascular que ocorre no final da gestação. De acordo com esses autores, o remodelamento se deve à ativação de células uNK e macrófagos levando à lise das células musculares lisas, morte celular e reabsorção.

É plausível a hipótese de que a administração de LPS pode causar mudanças no útero que resultam na aceleração do remodelamento vascular, aumento da permeabilidade vascular, do suporte sanguíneo e provavelmente do influxo de células imunológicas para o ambiente uterino como um mecanismo de restabelecimento da homeostase após a inflamação durante a gestação.

A diminuição da reatividade de α -actina observada no presente estudo ocorreu, sobretudo, na região mesometrial onde as células uNK estão localizadas (STEWART; PEEL, 1981; PAFFARO Jr et al., 2003; BULMER; LASH, 2005).

O aspecto morfológico da célula uNK alterada descrito anteriormente revela a ocorrência de grânulos aparentemente vazios. Estudos *in-vitro* utilizando células mononucleares periféricas em cultura demonstraram que o tratamento com LPS induziu proliferação e ativação da citotoxicidade das células NK periféricas (GOODIER; LONDEI, 2000; MIRANDA et al., 1998). No entanto, para que isso ocorra parece ser necessária a presença de células dendríticas quiçá por mediar a ativação das células NK por liberarem citocinas estimulatórias (GOODIER; LONDEI, 2000).

O LPS parece estimular a expressão de IL-12 em células trofoblásticas conforme postulado por Abrahams et al. (2004), além de estimular a expressão de IL-12 e IL-18 em macrófagos (D'ANDREA et al., 1992; OKAMURA et al., 1995). Wang e colaboradores (2007) demonstraram que o Hormônio Liberador de Corticotrofina, que se encontra em níveis aumentados durante a sepse, é capaz de aumentar a sensibilidade das células trofoblásticas no reconhecimento de endotoxinas por aumentarem a expressão de TLR4 nessas células, que passam a liberar grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-8, que somados à IL-12, IL-18 e outras citocinas podem participar da ativação da citotoxicidade das células uNK.

De fato, 2h após a aplicação do LPS, as células uNK que passam a apresentar morfologia alterada, perdem a reatividade para perforina e, pela primeira vez, demonstramos que as células uNK respondem rapidamente ao estímulo inflamatório causado por endotoxinas bacterianas, alterando sua morfologia e apresentando um perfil citotóxico. A administração prévia de Nimesulida preveniu a ativação da citotoxicidade das células uNK.

De acordo com Lima et al. (2014), as células uNK participam do processo de remodelamento das artérias uterinas não apenas pela produção de agentes vasoativos, mas também pela liberação de perforina por uma via de morte de células musculares lisas mediada por perforina descrita em outros trabalhos em diferentes modelos (HENDERSON et al., 1999, LIMA et al., 2014). No presente trabalho demonstramos que as células uNK deixam de expressar perforina nos seus grânulos após 2h da administração de LPS sugerindo que esse desafio inflamatório é capaz de disparar a liberação de perforina concomitante à perda da marcação para α -actina nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos do útero, com a participação da enzima COX-2 nesse processo.

Os efeitos de endotoxinas sobre a circulação estão bastante estabelecidos na literatura, como por exemplo, o efeito na redução da resistência vascular que leva à queda da pressão arterial. Particularmente durante a gestação, ocorre diminuição da resistência vascular periférica (por influência de mediadores como prostaciclina, NO e hormônios gestacionais) e aumento da frequência cardíaca, com conseqüente queda da pressão arterial e aumento do débito cardíaco. Neste sentido, a sepse na gestação poderia causar diversos problemas para o desenvolvimento do feto em função da baixa perfusão do ambiente uterino.

A reflexão sobre os resultados obtidos até agora poderia nos levar a crer que a inibição da COX-2 poderia ser benéfica em uma condição de inflamação durante a gestação, uma vez que impede o influxo excessivo de células uNK imaturas no útero, a diminuição do número de células uNK maduras concomitante a prevenção do aumento do número de células uNK alteradas. A inibição da COX-2 também impediu a liberação de perforina por essas células bem como preveniu a diminuição da expressão de α -actina em vasos sanguíneos uterinos após a inflamação induzida por LPS.

No entanto, o número de filhotes nascidos de mães tratadas com nimesulida+LPS no período mediano da gestação foi ainda menor do que o número

de filhotes que nasceram das mães que receberam apenas LPS no mesmo dia de gestação. A injeção apenas de nimesulida não causou nenhum efeito na prole, e por isso, a inibição de COX-2 parece bloquear a resposta do organismo frente a SRIS causada pelo LPS.

Dessa maneira, o influxo de células uNK imaturas, as alterações morfológicas e funcionais nas células uNK maduras sugerindo a ativação da citotoxicidade destas células, concomitante à vasodilatação e diminuição da reatividade para α -actina, parecem ser um conjunto de respostas do organismo frente ao desafio causado pelo LPS. Impedir o organismo de responder a esse desafio via bloqueio da COX-2 parece prejudicar à gestação, aumentando ainda mais a perda fetal já observada no grupo LPS.

A literatura dá suporte a essa hipótese, uma vez que autores afirmam que a inflamação é um evento intrinsecamente benéfico que leva à remoção de fatores nocivos, bem como à restauração da estrutura do tecido e função fisiológica (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Portanto, o comprometimento, causado pelo inibidor de COX-2, da resposta do organismo frente à inflamação induzida durante a gestação é prejudicial para o desenvolvimento fetal; porém, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo.

CAPÍTULO II

II. Deficiência de Fator de Crescimento Placentário

RESUMO

Fator de crescimento placentário (PGF) é um fator de crescimento angiogênico pleiotrópico que se encontra elevado durante a gravidez. Embora os padrões normais e anormais de PGF plasmático materno já estejam descritos na literatura, o papel preciso do PGF na angiogênese útero-placentária são indefinidos. Muitas mulheres que expressam baixos níveis de PGF, sobretudo na metade da gravidez, apresentam progressão para síndromes hipertensivas como a pré-eclâmpsia. Esse tipo de complicação gestacional está relacionada com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares (CV) pós-parto tanto para mães quanto para os filhos, entretanto, não se sabe se baixos níveis de PGF aumentam o risco de doenças CV. Para avaliar a hipótese de que a deficiência de PGF limita a adaptação CV durante o período gestacional tardio contribuindo para o aumento do risco de complicações cardiovasculares, foram analisadas a estrutura e função do sistema cardiovascular em camundongos C57BL/6 (*Pgf^{+/+}*) e *Pgf^{-/-}* no período gestacional. Além disso, estruturas vasculares cerebrais foram analisadas pela técnica de moldagem vascular por perfusão com polímero e os animais dos dois grupos experimentais foram submetidos a testes comportamentais. A avaliação hemodinâmica por radiotelemetria mostrou que as mães, no cruzamento *Pgf^{-/-}* x *Pgf^{-/-}*, tiveram um declínio maior e mais sustentado na pressão arterial média em meados de gravidez do que as mães do grupo controle, mas a recuperação após a implantação do transmissor era rara. A avaliação hemodinâmica por pletismografia de cauda mostrou que os animais *Pgf^{-/-}* apresentaram maior pressão arterial (PA) no início e final da gestação com um maior intervalo de queda da PA após o período da implantação do blastocisto. Menor débito cardíaco materno e volume sistólico foram observados após o meio da gestação dos animais knockout quando comparados com animais controle. Além disso, esses animais não apresentaram o aumento no peso do ventrículo esquerdo (VE) naturalmente observado em *Pgf^{+/+}*

no final da gestação. A expressão gênica de *Nos3* e *Nos2* no VE é maior nos animais *Pgf^{-/-}* durante o período mediano da gestação. Foram observadas anomalias estruturais glomerulares e hipertrofia renal em camundongos *Pgf^{-/-}* não gestantes, durante a gestação e pós-parto. Assim, a deficiência de PGF limita adaptações fisiológicas e estruturais do sistema CV e Renal durante a gestação de camundongos. Estes resultados podem ter paralelos na gravidez humana e se relacionam com o aumento do risco de complicações CV pós-parto, que são sequelas de gestações de pré-eclâmpsia. A técnica de moldagem vascular com polímero revelou que a estrutura vascular central do cérebro da prole *Pgf^{-/-}* é deficiente, e testes comportamentais mostraram que isso tem reflexo em déficit cognitivo. Assim, a deficiência gestacional PGF também prejudica a regulação da pressão arterial materna e desenvolvimento vascular em órgãos essenciais da progênie como o cérebro.

Palavras-chave: Remodelamento cardíaco. Risco cardiovascular. Ecocardiografia. Círculo de Willis. Estrutura renal. Vasculogênese cerebral.

ABSTRACT

Placental growth factor (PGF) is a pleiotropic angiogenic growth factor elevated during pregnancy. Although normal and abnormal patterns of maternal plasma PGF are well known, the precise roles of PGF in uteroplacental angiogenesis, blood pressure regulation, vasculogenesis, as well as cardiovascular (CV) and renal adaptation are undefined. Many women who express low levels of PGF over mid-pregnancy, progress to the acute, emergency, hypertensive syndrome of preeclampsia (PE). This kind of gestational complication elevates postpartum cardiovascular disease risks for both mothers and offspring. In many pre-eclamptic women, plasma placental growth factor concentrations are lower than normal, however, it is unknown if lower PGF elevates postpartum CV risk. We hypothesized that PGF deficiency limits maternal CV adaptations during mid-late pregnancy and contributes to postpartum maternal CV risk elevation. Cardiovascular function and structure were evaluated in *Pgf^{-/-}* and C57BL/6 (B6/*Pgf^{+/+}*) mice across pregnancy and postpartum. Furthermore, cerebral vascular structures were analyzed by polymer vascular casting technique and animals from both experimental groups were subjected to behavioral testing. Hemodynamic assessment by radiotelemetry showed *Pgf^{-/-}* x *Pgf^{-/-}* dams had a larger and more sustained mid-pregnancy decline in mean arterial pressure than controls but recovery post-transmitter implantation was rare. Hemodynamic assessment by tail cuff plethysmography showed that *Pgf^{-/-}* mice had higher blood pressure in early and late pregnancy with a longer interval of depressed systolic pressure after implantation. Lower maternal cardiac output and stroke volume were present after mid-gestation versus *Pgf^{+/+}*. *Pgf^{-/-}* left ventricular (LV) mass was less than in *Pgf^{+/+}* and expected gestational increases in LV mass were observed only in *Pgf^{+/+}*. *Nos3* and *Nos2* expression were elevated in mid-gestation *Pgf^{-/-}* LV. Structural anomalies were present in virgin *Pgf^{-/-}* glomeruli and renal hypertrophy was associated with gestation and postpartum. Thus, PGF deficiency limits physiological and structural adaptations of the mouse maternal CV and renal systems over late pregnancy. These results may have parallels in human pregnancy and relate to the postpartum gains in CV risk that are sequelae to pre-eclamptic gestations. Polymer vascular casting of offspring brains and behavioral testing revealed aberrant central vascular structure and major cognitive deficits in

Pgf^{-/-}. Thus, gestational PGF deficiency additionally impairs regulation of maternal arterial pressure and vascular development in key organs of progeny such as the brain.

Keywords: Cardiac remodeling. Cardiovascular risk. Echocardiography. Circle of Willis. Kidney structure. Brain Vasculogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	- Doenças Cardiovasculares
DC	- Débito Cardíaco
DG	- Dia Gestacional
DIC	- Delineamento Inteiramente Casualizado
Eng	- Endoglina
PGF	- Fator de Crescimento Placentário
FC	- Frequência Cardíaca
GAPDH	- Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
IL	- Interleucina
IR	- Índice de Resistência
MAP	- Pressão Arterial Média
NO	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico Sintase
eNOS	- Óxido Nítrico Sintase endotelial
iNOS	- Óxido Nítrico Sintase induzida
PA	- Pressão Arterial
PAS	- Ácido Periódico de Schiff
PBS	- Tampão Fosfato Salina
PD	- Pressão Diastólica
PE	- Pré-eclâmpsia
PFA	- Paraformaldeído
PGF	- Fator de crescimento placentário
PP	- Pressão de Pulso
PS	- Pressão Sistólica
PSAR	- Pico Sistólico Arterial Renal
sENG	- Endoglina Solúvel
sFit1fms	- Tirosina-quinase 1
uNK	- Natural Killer uterinas
VDF	- Velocidade Diastólica Final
VE	- Ventrículo Esquerdo

- VEGF** - Fator de Crescimento do Endotelial Vascular
- VEGFR-1** - Receptor 1 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
- VEGFR-2** - Receptor 2 do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
- VS** - Volume Sistólico
- Δ MAP** - Análise da Pressão Arterial Média Subtraída da Linha Base

2 REVISÃO DE LITERATURA

O endotélio vascular é uma das estruturas mais versáteis do corpo, apresentando uma grande variedade de funções tais como troca de substâncias essenciais e funções reguladoras. Uma propriedade fundamental das células endoteliais vasculares é a capacidade para proliferar e formar redes de capilares. Este processo, conhecido como angiogênese, é de grande importância em condições patológicas ou normais, como por exemplo no processo de cicatrização de feridas, crescimento cíclico do corpo lúteo, crescimento de tumores e também durante o desenvolvimento embrionário (RAMSEY; DONNER, 1980; GILBERT, 1988).

Um dos principais fatores que participam desses processos é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (PHILLIPS et al., 1990; JAKEMAN et al., 1993; BREIER et al., 1992; KIM et al., 1993; MYOKEN et al., 1991; MILLAUER et al., 1994). Ele que também exerce função relacionada à permeabilidade de microcirculações (KECK et al., 1989; CONNOLLY et al., 1989).

O Fator de Crescimento Placentário (PGF) é um fator de crescimento angiogênico, com características pró-inflamatórias e membro da família do VEGF (VRACHNIS et al., 2013). O PGF exerce sua atividade angiogênica ao se ligar ao receptor de VEGF1 também conhecido como *fms-tirosina-quinase 1* (sFlt1/VEGFR1) competindo dessa maneira com o VEGFA pela ligação nesse receptor, mas permitindo a ligação desse último ao VEGFR2 e com isso, os efeitos do VEGF na presença do PGF são potencializados (PARK et al., 1994). No entanto, evidências sugerem que a participação do PGF no processo de angiogênese vai além, atuando em outros mecanismos como na regulação da expressão gênica de VEGFA, do fator de crescimento de fibroblasto, do fator de crescimento derivado das plaquetas e de metaloproteinases (MARCELLINI et al., 2006; ROY et al., 2005).

É importante salientar que a ação do PGF não se limita à estimulação apenas de células endoteliais conforme Carmeliet et al. (2001) e Ziche et al. (1997), mas também atuam ao estimular a proliferação de fibroblastos mesenquimais e ao recrutar células progenitoras mielóides e macrófagos para os sítios da

neoangiogênese (YONEKURA et al., 1999; HATTORI et al., 2002; RAFII et al., 2003; SELVARAJ et al., 2003).

Existem quatro isoformas do PGF descritas em humanos até o momento descritas por Verlohren et al. (2012) e De Falco (2012) as quais podem ser produzidas por células trofoblásticas (fetais) assim como por células endometriais maternas, incluindo as células uNK (TAYADE et al., 2007, LI et al., 2001). Os camundongos expressam gene homólogo ao gene PGF2 de humanos e a depleção genética para *Pgf* em camundongos de diferentes linhagens não causa alteração nos números de filhotes por ninhada sendo, dessa forma, o PGF foi considerado por alguns autores como não significante para o desenvolvimento (DEWERCHIN; CARMELIET, 2012; CARNEVALE; LEMBO, 2012; TSIARAS; POPPAS, 2010).

Em contrapartida, estudo histológico do sítio de implantação embrionária de camundongos *Pgf*^{-/-} demonstrou um aumento no número de células uNK, muitas das quais se apresentavam binucleadas. Além disso a região do labirintotrofoblásto estava menor nesses animais e foi constatado um atraso no remodelamento das artérias espiraladas uterinas (TAYADE et al., 2007).

Estudos demonstraram que o PGF apresenta importantes funções cardioprotetoras (IWASKI et al., 2011; CARNEVALE; LEMBO, 2012; LUTTUN et al., 2002). Devido à sua expressiva participação em situações patológicas ou estressantes o PGF tem sido considerado um candidato atraente para abordagens terapêuticas relacionadas às doenças cardiovasculares (IWASKI et al., 2011; CARNEVALE; LEMBO, 2012).

Outros genes que participam da modulação vascular e que apresentam importantes funções cardioprotetoras são os genes para óxido nítrico sintase indizível (*Nos2/iNOS*) e endotelial (*Nos3/eNOS*), bem como o gene para endoglina (*Eng*) (GUO et al., 1999; TOPORSIAN et al., 2005). Segundo Myatt et al. (1997), o NO é um potente vasodilatador que participa da manutenção da baixa resistência vascular na circulação uteroplacentária, bem como de processos de angiogênese (CHANG et al., 1992; MYATT et al., 1992; McCARTHY et al., 1994; DUDA; FUKUMURA; JAIN, 2004).

A endoglina é uma glicoproteína que participa da manutenção da homeostasia vascular e quiescência do endotélio que também influencia a expressão dos genes para a produção de NO (TROPORSIAN et al., 2005; GREGORY et al., 2014).

Estudos voltados para situações de infartos cardíacos e estresse por pressão elevada no circuito arterial tem enfatizado a importância do PGF na hipertrofia adaptativa e na promoção da angiogênese, uma vez que o Déficit de PGF foi intensamente correlacionado com o prognóstico de redução na capacidade de reparo cardíaco e de sobrevivência nestas patologias cardíacas (IWASKI et al., 2011; CARNEVALE; LEMBO, 2012; LUTTUN et al., 2002; ACCORNERO et al., 2011).

A gestação pode ser considerada como um desafio fisiológico para o sistema cardiovascular (CV) da mãe e é, muitas vezes, referido clinicamente como um "teste de stress" CV (CRAICI et al., 2008). Dentre as mudanças cardiovasculares maternas induzidas pela gravidez incluem um aumento de 30-40% no volume de sangue, um aumento de 30-60% do débito cardíaco (DC), hipertrofia cardíaca temporária e remodelação das artérias espiraladas uterinas (HUNTER; ROBSON, 1992; HARRIS; APLIN, 2007; TSIARAS; POPPAS, 2010).

As mudanças fisiológicas que ocorrem durante a gestação são de fundamental importância para a manutenção dos padrões vitais maternos e fetais em uma situação de desafio hemodinâmico, e a incapacidade do organismo materno em se adaptar à essa condição está relacionada com complicações gestacionais. Curiosamente, as principais complicações gestacionais, como a pré-eclâmpsia (PE), a restrição de crescimento intra-uterino e a diabetes gestacional, aumentam os riscos maternos e fetais para doenças cardiovasculares pós-parto (SATTAR; GREER, 2002; SMITH et al., 2009; ZHANG et al., 2011; BROSENS et al., 2011).

A PE é uma complicação gestacional de alto risco que ocorre em cerca de 5-10% das gestações, caracterizado pelo estabelecimento de um quadro de hipertensão muitas vezes acompanhada de proteinúria (POWERS et al., 2010). Atualmente, o único tratamento para PE é a expulsão da placenta e do feto, usualmente sendo feito pré-termo (ZHAO et al., 2010). Entretanto, alguns estudos em andamento se concentram na busca de terapêuticas visando a redução dos sintomas clínicos bem como um mecanismo de prolongar a gravidez (THADHANI et al., 2011).

Pouco se sabe sobre os mecanismos associados à PE que culminam com o aumento do risco para o sistema CV da mãe e de seus descendentes (SMITH et al., 2009). No entanto, sabe-se que muitas mulheres que sofrem de PE apresentam

baixas concentrações plasmáticas de PGF antes mesmo do aparecimento clínico da doença (WELCH et al., 2006). Dessa maneira, foi postulado no presente trabalho que a deficiência de PGF poderia ser responsável pela elevação do risco CV pós-parto que ocorre em situações de complicação gestacional.

O PGF é amplamente expresso no útero gravídico conforme descrito por Tayade et al. (2007) e GU et al. (2008) e os níveis de PGF no plasma oscilam ao longo da gravidez, aumentando em meados da gestação, atingem o pico por volta da 26ª a 30ª semanas em humanos e entram em declínio no final da gestação até o parto (VRACHNIS et al., 2013; WELCH et al., 2006). Uma das formas de PE apresenta como marca característica a ocorrência de baixos níveis plasmáticos de PGF e, por isso, essa é uma medida que pode ser utilizada no início da gestação como prognóstico para essa complicação gestacional, sendo que baixos níveis de PGF indicam uma propensão a desenvolver esta condição clínica com risco de vida (POWERS et al., 2010).

O aumento nos níveis de sFlt1/VEGFR1 solúvel e endoglin solúvel (sENG) também são característicos de PE, que ao lado dos níveis de PGF podem ser utilizados como ferramentas de avaliação dessa doença (MAYNARD et al., 2003; POWERS et al., 2010; ZHAO et al., 2010; MUTTUKRISHNA et al., 2011; VERLOHREN et al., 2012). Os mecanismos pelos quais estes marcadores moleculares estão envolvidos na PE são em grande parte desconhecidos, mas as alterações no balanço destas moléculas angiogênicas podem conduzir a uma fraca perfusão placentária e/ou stress hipóxico placentária (POWERS et al., 2010; VERLOHREN et al., 2012).

O ambiente uterino pré-natal deficiente ou com complicações pode repercutir em prematuridade do parto muitas vezes associado ao baixo peso do bebê no momento do nascimento, e evidências empíricas sugerem que este fato, por sua vez, está associado à redução da função cognitiva na infância, adolescência e idade adulta (MARTYN et al., 1996; SORENSEN et al., 1997; SOMMERFELT et al., 1998; MATTE et al., 2001; SHENKIN et al., 2001; BHUTTA et al., 2002; RICHARDS et al., 2002; RAIKKONEN et al., 2009; STRANG-KARLSSON et al., 2010; PYHALA et al., 2011; ERICKSON et al., 2010) e com o declínio cognitivo até a velhice (GALE et al., 2003).

É de conhecimento que a PE ameaça à saúde e o bem-estar tanto da mãe quanto do feto e está entre as causas subjacentes fundamentais da prematuridade

e restrição de crescimento intrauterino. Assim, afetar o ambiente uterino pode comprometer o desenvolvimento fetal, e a doença hipertensiva pode apontar candidatos, como o PGF por exemplo, que participam dos mecanismos pelos quais a adversidade pré-natal está associada com a função cognitiva na vida adulta.

Para suportar a hipótese de que o PGF apoia adaptações adequadas do coração durante o desafio hemodinâmico gestacional, foram realizadas ecocardiografias (KULANDAVELU et al., 2006; AASA et al., 2013), radiotelemetria para aferir a pressão arterial média e pletismografias de cauda para a pressão arterial sistólica, seguido de estudos histopatológicos e expressão de genes para analisar adaptações cardíacas durante a gestação de camundongos *Pgf^{-/-}* e controle (*Pgf^{+/+}*). Com o fito de elucidar a importância e função do PGF na adaptação cardiovascular e na vasculogênese embrionária, estruturas vasculares cerebrais foram analisadas pela técnica de moldagem vascular por perfusão com polímero e para avaliar se a deficiência de PGF participa dos prejuízos da função cognitiva na vida adulta, animais dos dois grupos experimentais foram submetidos a testes comportamentais que tangem os parâmetros pertinentes à essa questão.

3 JUSTIFICATIVA

Complicações hipertensivas caracterizam um dos problemas obstétricos mais incidentes na atualidade. Destes, destaca-se a pré-eclâmpsia, um distúrbio multissistêmico que leva à óbito cerca de 50 mil mulheres por ano em países desenvolvidos, podendo chegar a índices ainda mais alarmantes em países subdesenvolvidos pela precariedade com os cuidados no período perinatal. Além disso, a única terapêutica efetiva que é de conhecimento na atualidade é a liberação da placenta de maneira impositiva pela indução do parto prematuro, que por sua vez acarreta em elevada taxa de morbidades para o concepto.

Curiosamente, apesar de descrita desde a Idade Antiga, a pré-eclâmpsia é uma complicação gestacional que permanece até os dias atuais sem etiologia bem definida. O que está bem caracterizado é que essa síndrome, embora tenha manifestações clínicas no final da gestação, apresenta fisiopatologia no período de neoangiogênese útero-placentária e formação da placenta, num momento onde o remodelamento vascular uterino adequado é essencial para garantir a saúde materna e a nutrição eficaz do embrião.

Complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia, que se caracteriza pelo estabelecimento de um quadro de hipertensão muitas vezes acompanhado de proteinúria, estão associadas com baixos níveis plasmáticos do Fator de Crescimento Placentário. Além disso, a pré-eclâmpsia também parece estar relacionada à altos índices de complicações cardiovasculares na mãe e problemas cognitivos em filhos, no entanto, não se sabe exatamente o envolvimento do PGF nesses processos.

Por isso, faz-se necessário o preenchimento dessa lacuna no conhecimento que tange essa importante complicação gestacional no que diz respeito à sua correlação com complicações cardiovasculares e cognitivas futuras, destacando o PGF como candidato à um fator chave nesse processo.

Camundongos depletados geneticamente para PGF (*Pgf^{-/-}*) representam um bom modelo de estudo para essa questão. O Dr. Peter Carmeliet (*Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular Link, Vesalius Research Center, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, Belgium*), o qual retém a patente do uso

desses camundongos, mantem colaboração com a Dra. B. Anne Croy (*Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON, Canada*) que é referência internacional em pesquisa e desenvolvimento científico e que coordena um dos maiores grupos de pesquisa em células uNK e Fator de Crescimento Placentário.

O Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro mantém colaboração com a Dra. B. Anne Croy desde 2002, e após aprovação de nossa proposta de realização de doutorado sanduiche pelo Programa Ciências sem Fronteira (processo número: 245282/2012-2), foi possível a realização do estudo descrito nesse relatório no qual foram utilizados camundongos *Pgf^{-/-}* buscando esclarecimentos quanto ao papel do PGF na gestação.

4 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram divididos em objetivos gerais e específicos.

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a influência da deficiência de PGF na adaptação cardiovascular e renal durante a gestação bem como na vasculogênese cerebral e suas consequências comportamentais em adultos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) aferir a pressão arterial de camundongos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* durante o período gestacional;
- b) avaliar a função cardíaca (Débito Cardíaco e Volume Sistólico) de maneira comparativa entre os grupos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* durante o período gestacional.
- c) comparar a estrutura, peso e histologia/morfometria cardíaca entre os grupos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* durante o período gestacional;
- d) analisar a expressão de genes em tecido cardíaco relacionados a adaptação cardíaca nos dois grupos experimentais;
- e) comparar a estrutura, peso e histologia/morfometria renal entre os grupos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* durante o período gestacional;
- f) avaliar as estruturas vasculares, em especial a vascularização cerebral, pela técnica de Moldagem Vascular por Perfusão com Polímero;

g) realizar testes comportamentais nos animais dos dois grupos experimentais verificando parâmetros relacionados à depressão, memória espacial e função cognitiva.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As informações específicas referentes aos animais utilizados, delineamento experimental, coleta de material, bem como a respeito dos testes e técnicas utilizadas estão discriminados a seguir.

5.1 ANIMAIS

Camundongos C57BL6/6J (B6/*Pgf*^{+/+}) foram adquiridos do laboratório Charles River (Wilmington, MA) e camundongos C57BL6/6J depletados para *Pgf* (*Pgf*^{-/-}) foram fornecidos por Dr. Peter Carmeliet (Universidade de Leuven, Bélgica). Os animais, mantidos no Biotério Central da Queen's University em ambiente com ciclo de luz (claro/escuro de 12h/12h) e temperatura (23±2°C) controlados, bem como livre acesso a alimentação e água foram acasalados singenicamente. A detecção do plug vaginal caracterizou o dia gestacional 0 (DG0). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Queen's University e estavam de acordo com as diretrizes de experimentação animal do Canadá.

5.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO

Para análise dos níveis plasmáticos do PGF, o sangue dos camundongos de ambos os grupos experimentais (n=5/grupo para cada período analisado) foi coletado por punção cardíaca no período pré-gestacional (não prenhe), gestacional (DG8, 10, 14 e 18) e pós-gestacional (30 dias pós-parto). A análise foi feita utilizando kit de ELISA (R&D Systems, #MP200) seguindo as instruções do fabricante. Os níveis plasmáticos de PGF foram expressos em pg/ml, sendo limite mínimo de detecção entre 1,14 e 1,8 pg/ml.

5.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA

5.3.1 Radiotelemetria

Os animais de ambos os grupos experimentais (n=10) foram anestesiados pela inalação de 5% de isoflurano em oxigênio e mantidos à 1,5-2% e receberam cirurgicamente um *probe* TA11PA-C10 radiotransmissor (Data Science International, St. Paul, MN, USA) na artéria carótida comum. Todos os animais *Pgf^{f/+}* que passaram pela cirurgia se recuperaram com sucesso sem nenhuma complicação. Esses animais passaram por coleta de dados completa sendo 4 dias de linha base (período pré-gestacional), durante toda a gestação e 48h pós-parto analisados como descrito anteriormente por (BURKE et al., 2010). Da mesma maneira, animais *Pgf^{f/-}* (n=10) sofreram o mesmo procedimento experimental, no entanto apenas 2 animais foram capazes de recuperar da cirurgia.

Os animais tiveram um período de 7-10 dias de recuperação pós-cirúrgica. As fêmeas que passaram pelo procedimento de implantação do *probe* foram acasaladas com machos de mesma linhagem e no dia de detecção do plug vaginal iniciou-se a mensuração contínua (24h de coleta de dados) utilizando o sistema de aquisição *Dataquest ART Acquisition System* (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA; version 4.1) e os parâmetros coletados foram pressão arterial média (MAP), Pressão Sistólica (PS), Pressão Diastólica (PD), Frequência Cardíaca (FC) e Pressão de Pulso (PP). A coleta de dados foi registrada pelo transmissor durante de 30 segundos a cada 4 minutos, com um total de 360 mensurações a cada 24horas. Uma vez que o intervalo noturno interferiu nos parâmetros de atividade cardiovascular, apenas os registros do período diurno foram analisados. O limitado número de animais *Pgf^{f/-}* (n=2) que se recuperou da cirurgia impediu a aplicação de análise estatística, sendo os resultados expressos em média \pm SEM.

5.3.2 Pletismografia de cauda

Como uma alternativa à radiotelemetria, os animais de ambos os grupos experimentais (n=10) tiveram sua pressão arterial aferida diariamente pelo método de pletismografia de cauda (Coda High Throughput 4 chamber, Kent Scientific Corp). Os animais foram ambientalizados com o equipamento durante 14 dias antes de ser aferida sua linha base de pressão arterial (no mínimo 5 dias). Após esse procedimento, as fêmeas foram acasaladas singenicamente e tiveram sua pressão arterial aferida durante a gestação. O equipamento registra 25 ciclos e considera a mensuração aceitável quando o animal não se movimentar. A média de cada animal foi normalizada com os valores individuais da linha de base (pressão arterial média no período pré-gestacional) e os valores foram submetidos à análise estatística.

5.3.3 Ecocardiografia

Para avaliar a função cardiovascular materna, foi utilizado o sistema de ultrassom de alta frequência Vevo770 (VisualSonics, Toronto, Canadá) em camundongos anestesiados no período pré-gestacional e gestacional (DG 8, 10, 12, 14, 16 e 18) de ambos os grupos experimentais (n=5/grupo para cada dia analisado). Os animais foram anestesiados com a inalação de 5% de isoflurano em oxigênio e mantidos à 1,5-2% e para realizar o escaneamento cardíaco foi utilizado o transdutor de frequência central Vevo707B 30MHz.

A ultrassonografia de modo M foi feita no eixo paraesternal longitudinal do coração materno perpendicular à aorta sobre o Ventrículo Esquerdo na porção papilar central. Os parâmetros fisiológicos analisados foram débito cardíaco, volume sistólico, dimensões da câmara e volume diastólico. Foi realizado o escaneamento da artéria renal pelo transdutor Vevo704 40 MHz, bem como a mensuração do Doppler de ondas pulsáteis e cálculo do Índice de Resistência ($IR = \frac{\text{máximo de velocidade sistólica} - \text{mínimo da velocidade diastólica}}{\text{máximo de velocidade sistólica}}$).

5.4 ANÁLISE DA MASSA CARDÍACA E RENAL

Após a ultrassonografia, os animais foram eutanasiados com overdose do anestésico pentobarbital sódico e foi feita a coleta do coração e dos rins para a pesagem, sempre normalizando o peso do coração e dos rins com o tamanho da tíbia. Após esse procedimento, o coração foi dissecado de tal modo que teve suas câmaras separas. Estas foram individualmente pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para futura extração do RNA e análise molecular.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Camundongos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* tanto não prenhes como no período final da gestação (DG16) foram eutanasiados e perfundidos com paraformaldeído 4% (PFA) em PBS (0,05M) com duração de 15 minutos utilizando 30mL da solução de fixação. Coração e rins foram removidos, imersos em PFA e processados para embebição em parafina, procedidos para cortes histológicos (6 μ m) e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas histológicas coradas foram digitalizadas e analisadas utilizando microscópio de luz e software Zeiss AxionVision. Para a análise morfométrica do coração, foi feita a mensuração do maior diâmetro e espessura da parede da câmara do ventrículo esquerdo; enquanto que para a análise renal, 10 corpúsculos renais (Cápsula de Bowman e glomérulo) foram selecionados de maneira aleatória e fotografados para a mensuração da área de superfície do corpúsculo e do glomérulo tendo assim, pela subtração desses valores, a área do espaço de Bowman, além da quantificação do número de células/glomérulo.

5.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TECIDOS CARDÍACOS

O RNA foi extraído a partir do Ventrículo Esquerdo de camundongos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* não prenhes e prenhes (DG8 e DG14) utilizando o kit *High-pure tissue RNA isolation* (Roche Scientific Co), e para a obtenção do cDNA a partir do RNA total, foi realizada a reação de transcrição reversa com o Kit *high-capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Foi mensurado os níveis relativos de expressão de mRNA para *Nos3*, *Nos2*, e *Eng* em triplicatas comparados com a expressão do gene controle GAPDH (Roche Lightcycler 480 II). Os *primers* foram desenhados utilizando as sequências do *GenBank* e pelo Software *Primer Designer* versão 2.01 (*Scientific and Educational Software*) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica em tecidos cardíacos de ambos os grupos experimentais.

Genes	Sense (S) e Anti- Sense (A)	Sequência do <i>Primer</i>	Eficiência da curva padrão
<i>nos3</i>	S	CCAGGCTGGAAGCTGTAAC	1.897
	A	AGTGATGGCCGACCTGAT	
<i>nos2</i>	S	TTGAGGATGTGGSTGTGTG	1.913
	A	GAGTTAGGCTGCCTGAGATG	
<i>6Eng</i>	S	CACAACAGGTCTCGCAGAA	1.964
	A	GTCGTAGGCCAAGTGCAA	
<i>Gapdh</i>	S	TGACTCCACTCACGGCAA	2.023
	A	ACTCCACGACATACTCAGCAC	

Fonte: Do autor.

5.7 MOLDAGEM VASCULAR COM POLÍMERO

Camundongos *Pgf^{+/+}* e *Pgf^{-/-}* não prenhes (n=4 machos/grupo, n=4 fêmeas/grupo) foram anestesiados com pentobarbital sódico (100mg/kg; Ceva Sante Animale, Libourne, França) e perfundidos com solução contendo 140mM NaCl, 10mM KCl e 5mM EDTA (pH7.5) com a finalidade de remover o sangue intravascular e prevenir vasoconstrição. Após este procedimento, 2mL do polímero Batson's #17 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) foi injetado na aorta torácica e mantido por 24h para a polimerização. Subsequentemente, tecidos moles e ósseos foram digeridos em 1M NaOH e 5% do detergente Contrad 70 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Após a digestão completa dos tecidos (aproximadamente 8 semanas) a estrutura vascular cerebral representada pelo polímero foi fotografada em microscópio de dissecação Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) com o auxílio do software Motic Plus 2.0 (Motic, Hong Kong, China).

5.8 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para avaliar a função cerebral, camundongos machos *Pgf^{+/+}* e *Pgf^{-/-}* (n=5) foram mantidos em suas caixas no local onde seriam realizados os testes comportamentais 1 hora antes do início dos testes. Os animais foram submetidos (apenas uma vez) aos testes de Labirinto em Y e Suspensão pela Cauda conduzidos em local com iluminação reduzida (luz vermelha), com mínimo de ruído externo e entre as 17h e 18h.

O Teste de Labirinto em Y foi realizado em um aparato com três braços idênticos (40 x 4,5 x 12cm) dispostos em uma angulação de 120° entre si, situado em uma local com iluminação reduzida. As paredes de cada braço apresentavam imagens peculiares, sendo estas distintas entre cada braço com a função de fornecer pistas visuais. Os camundongos foram colocados individualmente no centro do labirinto podendo, durante os 10min de duração do teste, explorar os 3 braços. O teste foi filmado e a avaliação do vídeo consistiu na quantificação do

parâmetro de alternância espontânea, sendo que o sucesso na alternância era caracterizado como entradas consecutivas em um novo braço antes de voltar para os dois ramos visitados anteriormente.

Alternância percentual foi calculada como:

$$\% \text{ Alternância} = \left(\frac{\text{número de alternâncias bem sucedidas}}{\text{total de entrada nos braços} - 2} \right) \times 100$$

O Teste de Suspensão pela Cauda foi realizado como descrito por Steru et al. (1985) com o objetivo de avaliar parâmetros relacionados à depressão. Os camundongos foram suspensos individualmente pela cauda (com uma fita à 2cm da ponta da cauda) por um tempo total de 6 minutos em uma caixa (25 x 25 x 30cm). A avaliação do vídeo, feita nos 5 minutos finais, consistiu na mensuração do tempo de latência para o primeiro evento de imobilização, tempo imóvel e número de eventos de imobilização.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise estatística foi feita utilizando o software estatístico *Prism 5.0* (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para a análise da Pressão Arterial Média dos animais *Pgf^{+/+}*, os valores foram comparados com a linha base adquirida no período pré-gestacional estudados pela análise de variância de uma via seguida do teste de múltiplas comparações de Dunnett's. O estudo comportamental representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA) seguida do teste de comparação das médias de Scott-Knott. As comparações entre os grupos controle e *Pgf^{-/-}* durante a gestação foram proferidas utilizando ANAVA de duas vias e para testar diferenças em dias de gestação específicos foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da media (SEM) e valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

Análise de regressão foi utilizada para determinar as diferenças de mudanças ao longo do tempo, com uma inclinação da curva significativamente diferente de zero.

6 RESULTADOS

A metodologia aplicada propiciou a obtenção de diversos resultados que elucidaram a participação do PGF durante a gestação, e as consequências do déficit desse fator para o sistema cardiovascular e renal. Os resultados obtidos se encontram descritos a seguir.

6.1 NÍVEIS DE PGF PLASMÁTICO DETECTADOS POR ELISA

A mensuração dos níveis de PGF foi realizada em ambos os grupos experimentais nos períodos pré-gestacional (não prenhe), durante a gestação (DG 8, 10, 14 e 18) e pós-parto (30 dias pós-parto). Como demonstrado na Figura 1, o Fator de Crescimento Placentário não foi detectado em nenhum dos períodos supracitados nos camundongos *Pgf^{-/-}*, entretanto, esse fator foi detectado em camundongos *Pgf^{+/+}* em todos os períodos estudados sendo baixos os níveis no período pré-gestacional ($10,3 \pm 3,2$ pg/ml) e pós-parto ($9,8 \pm 4,3$ pg/ml). Níveis significativamente maiores foram observados no período entre DG10 ($71,6 \pm 4,4$ pg/ml) e DG14 ($37 \pm 6,2$ pg/ml) e apresentaram um declínio no DG18 ($29,4 \pm 10,1$ pg/ml). A concentração plasmática de PGF foi maior no DG10, sendo significativamente maior do que a concentração plasmática observada em camundongos virgens, DG8 e DG18, mas não significativamente diferente do observado no DG14.

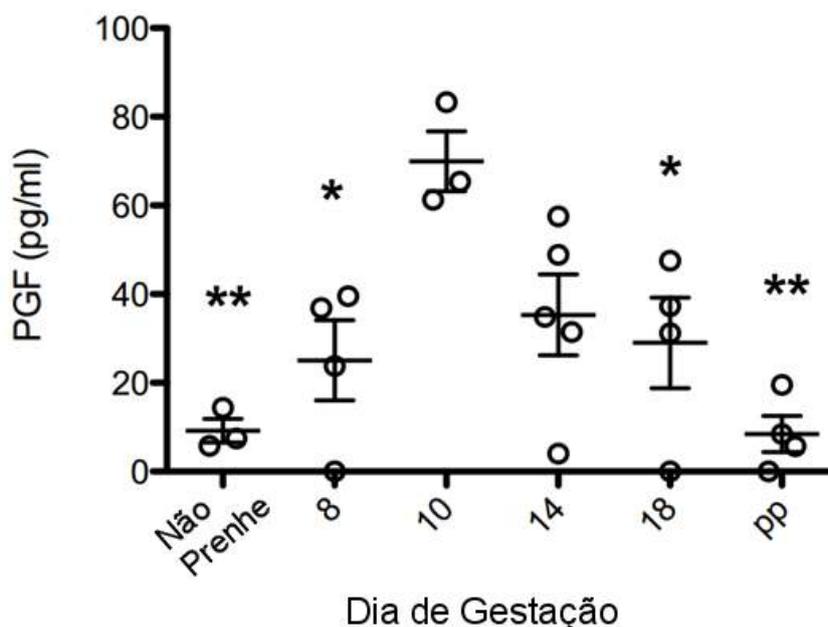


Figura 1 - Concentração plasmática de PGF em camundongos *Pgf^{+/+}* obtida pela técnica de ELISA (n=5/período estudado). Camundongos *Pgf^{-/-}* apresentaram níveis de PGF indetectável (dado não demonstrado). A concentração de PGF em camundongos *Pgf^{+/+}* fêmeas apresentou maior concentração no DG10, sendo este utilizado para comparação com os demais pontos. * $p \leq 0.05$ para DG10, ** $p \leq 0.001$ para DG10.

Fonte: Do autor.

6.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO CARDÍACA

Os resultados obtidos pela radiotelemetria (Figura 2A) demonstraram que a linha base de pressão arterial média (MAP) em camundongos *Pgf^{+/+}* foi de $93,39 \pm 1,2$ mmHg enquanto que nos camundongos *Pgf^{-/-}* foi de $107,22 \pm 8,1$ mmHg. Os camundongos *Pgf^{-/-}* apresentaram pressão arterial mais elevada durante toda a gestação comparada com o grupo controle. As oscilações de pressão arterial observadas no grupo controle durante a gestação ocorrem de maneira semelhante às observadas no grupo *Pgf^{-/-}*, onde a pressão arterial segue similar à linha base até o DG6, ocorrendo uma leve queda seguida do retorno aos níveis anteriores de pressão arterial entre o período do DG9 e DG12. No final da gestação o grupo *Pgf^{-/-}* apresenta aparente aumento da pressão arterial média até o parto comparado com o grupo controle.

A análise da pressão arterial média subtraída da linha base (Δ MAP) representada na Figura 2B, demonstra que os animais *Pgf^{-/-}* apresentam um padrão deficiente de manutenção da pressão arterial durante a gestação, podendo ser observado um declínio mais acentuado no período próximo ao DG9 com um atraso na recuperação da MAP de aproximadamente 3 dias.

A falha na recuperação pós-cirúrgica do implante do probe de telemetria na carótida ocorreu em 80% (n=8) dos camundongos *Pgf^{-/-}*. A falha na recuperação pós cirúrgica para o implante do probe na artéria femoral também ocorreu em 7 (100% das tentativas) camundongos *Pgf^{-/-}*.

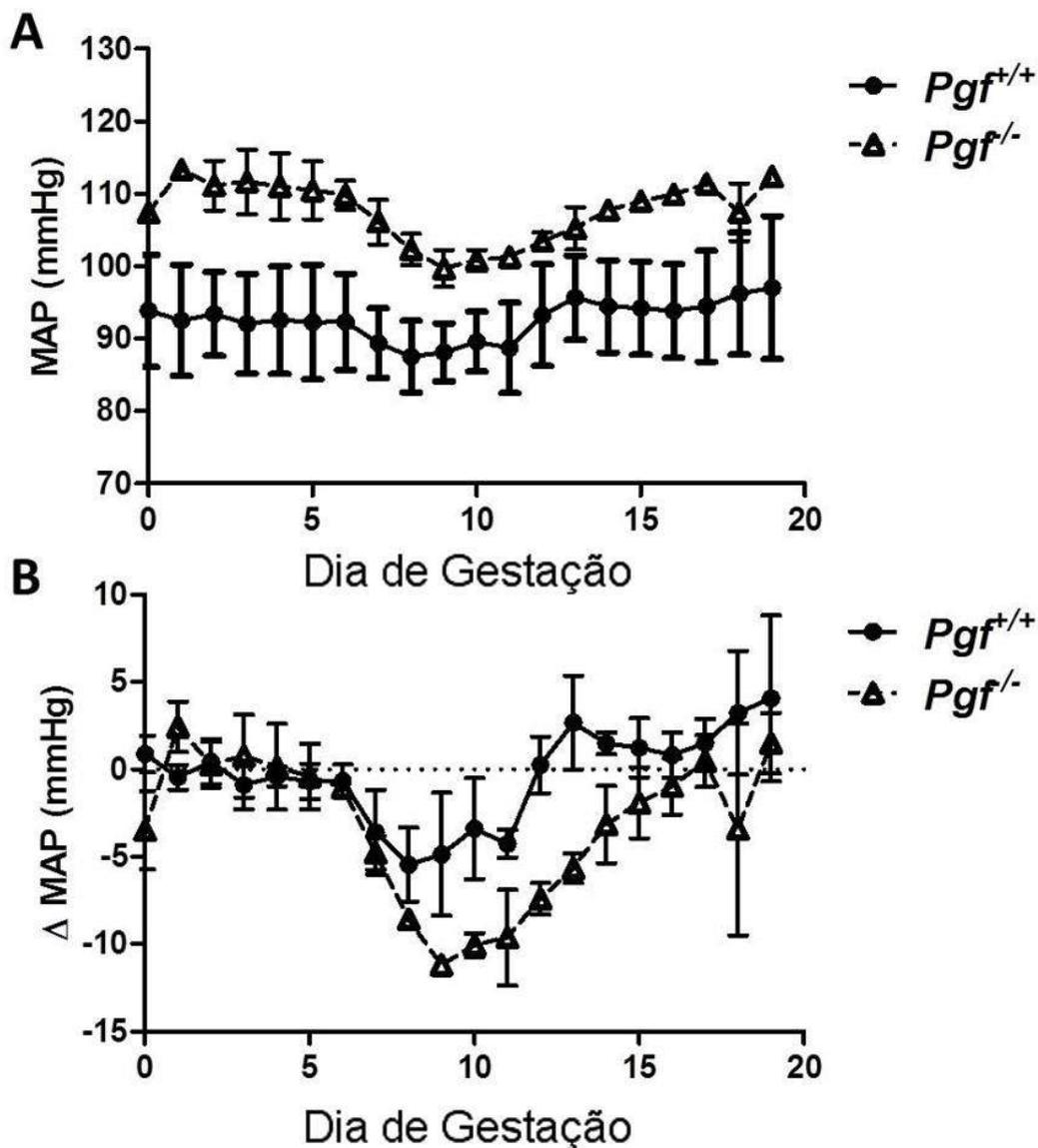
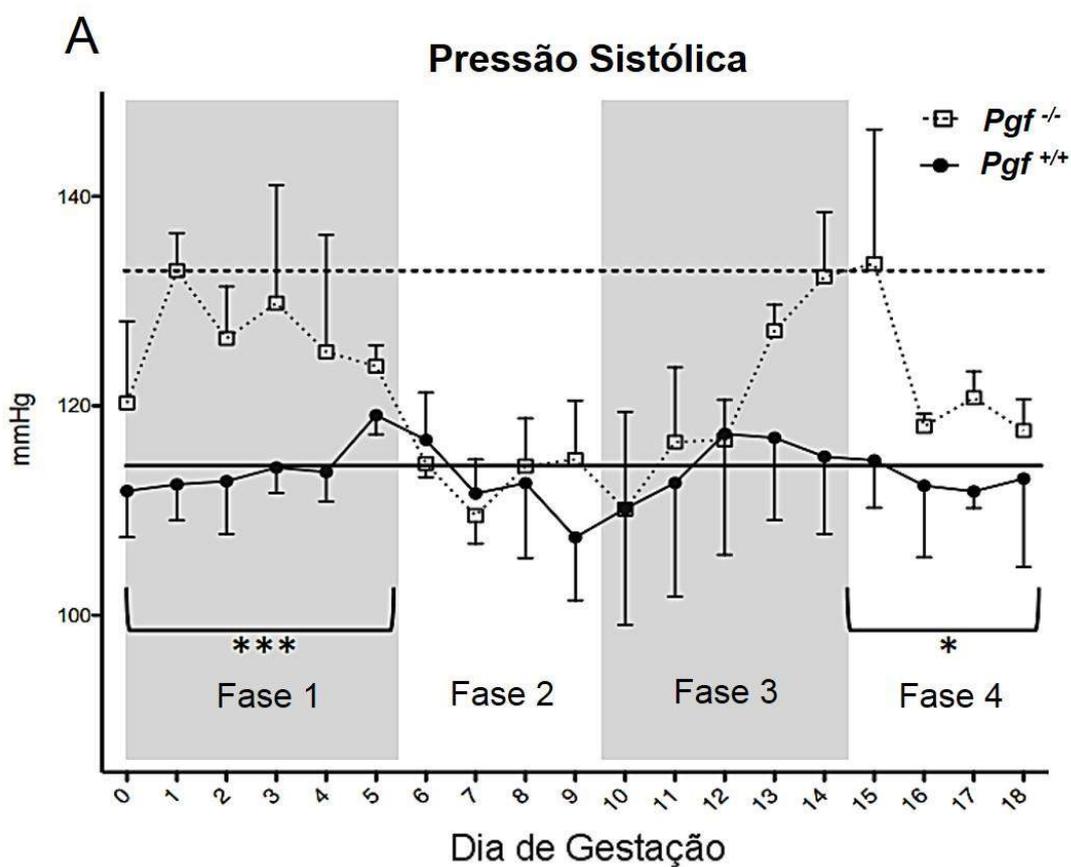


Figura 2 - Registro diurno da pressão arterial média (MAP; mmHg) por radiotelemetria em camundongos $Pgf^{+/+}$ (círculos, $n=10$) e $Pgf^{-/-}$ (triângulos, $n=2$) acasalados singenicamente. Representação da média dos dados brutos de pressão arterial (A); Representação da mudança da pressão arterial média durante a gestação sendo subtraído os valores de MAP pré-gestacional (B). O número limitado de camundongos do grupo $Pgf^{-/-}$ impossibilitou a análise estatística para comparação entre os grupos.

Fonte: Do autor.

Os resultados obtidos pela pletismografia de cauda (Figura 3) apresentaram padrão semelhante aos observados pela radiotelemetria. A pressão sistólica de camundongos $Pgf^{+/+}$ (Figura 3A) que no início da gestação seguiu os níveis da linha base, apresentou um declínio por volta do DG6 com o retorno aos padrões normais

de pressão sistólica por volta do DG12 permanecendo assim até o parto. Este padrão de oscilação da pressão arterial sistólica (Figura 3A) segue o mesmo padrão nos camundongos *Pgf*^{-/-}, entretanto, a análise da pressão sistólica em delta indica que essas respostas são mais exageradas (Figura 3B). A diferença entre os grupos experimentais comparando o delta da pressão sistólica durante a gestação demonstra significativo aumento no grupo *Pgf*^{-/-} comparado com o apresentado pelas fêmeas do grupo controle (p=0.055; Figura 3B).



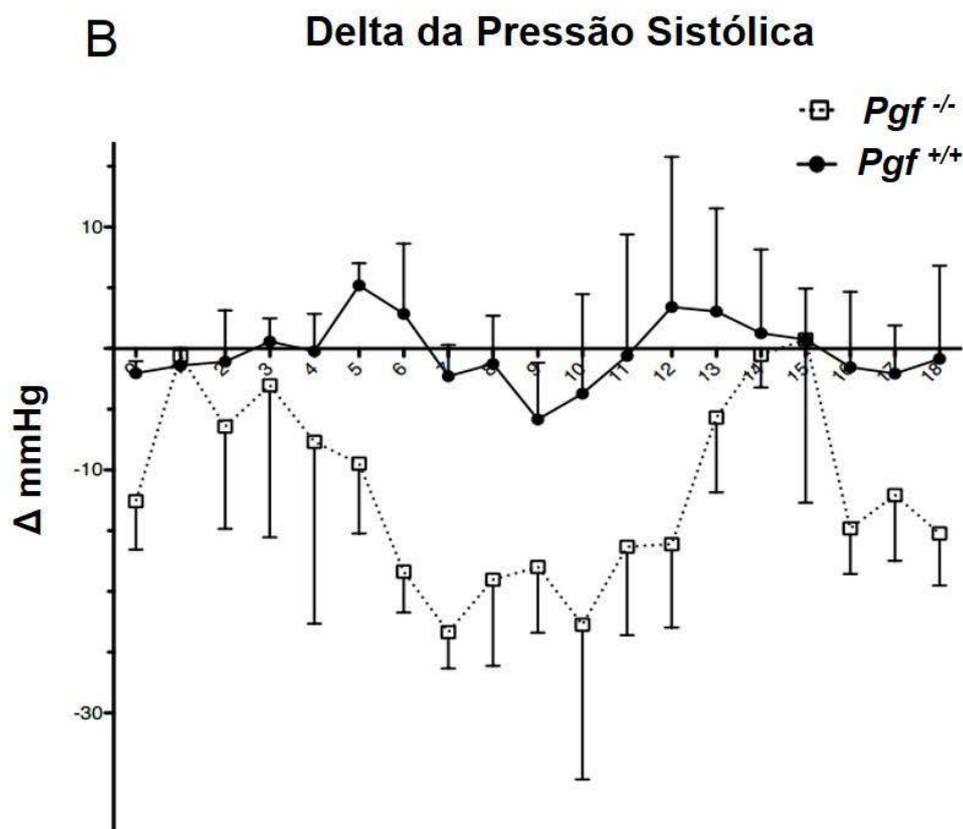


Figura 3 - Relação do PGF com as adaptações da função cardiovascular materna durante a gestação, referente à pressão arterial analisada em camundongos fêmeas treinadas, de ambos os grupos experimentais, utilizando pletismografia de cauda. Representação da média dos dados brutos de pressão arterial (A) segregados em fases de acordo com Burke et al. (2010). Linha base (pré-gestacional) indicada no grupo *Pgf*^{-/-} (linha horizontal pontilhada) e em *Pgf*^{+/+} (linha horizontal contínua). As oscilações em ambos os grupos seguem padrão similar, entretanto com magnitude acentuada em *Pgf*^{-/-} (B). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ comparando com os pontos de análise de *Pgf*^{+/+}.

Fonte: Do autor.

De acordo com Burke e colaboradores (2010) os resultados podem ser segregados em diferentes fases gestacionais, sendo que a primeira fase (DG0-5) representa o período pré-implantacional, a segunda fase (DG5-9) o período pós-implantacional que precede a placentação, a terceira fase (DG9-14) o período de abertura da circulação útero-placentária e final da placentação, quarta fase (DG14-18) representa o período de crescimento fetal com a placenta madura e parto. Ao segregarmos dessa maneira os resultados obtidos no presente trabalho, foi notada diferença significativa (Figura 3A) entre os grupos experimentais nas fases 1 (DG0-5) e 4 (DG14-18), sendo que em ambos os casos, as fêmeas *Pgf*^{-/-} apresentaram pressão sistólica significativamente maior que as fêmeas do grupo controle

($p=0.0002$ e $p=0.047$, respectivamente). Assim como observado na radiotelemetria, a pressão sistólica nos camundongos *Pgf^{-/-}* também apresenta queda mais consistente nas fases 2 e 3 bem representada na figura 2B, podendo ser notada a queda acentuada do delta da pressão sistólica e lento retorno aos níveis próximos dos valores da linha base.

A participação do PGF na adaptação funcional cardíaca durante a gestação foi demonstrada pela análise ecocardiográfica. Por meio desta técnica foi possível observar que não houve diferença na função cardíaca em animais virgens ao comparar os dois grupos experimentais. Entretanto, a falta do Fator de Crescimento Placentário parece ser crítica para determinados dias da gestação, sendo que foi possível observar diferença significativa em alguns parâmetros avaliados. Em camundongos *Pgf^{+/+}*, tanto o débito cardíaco como o volume sistólico aumentaram com o progresso gestacional, fato presumível para gestações normais. Contudo, o aumento desses mesmos parâmetros (DC e VS) não foi observado em camundongos deficientes em PGF (Figura 4A e 4B). O débito cardíaco e o volume sistólico foram maiores nos camundongos *Pgf^{+/+}* quando comparados com camundongos *Pgf^{-/-}* durante toda a gestação ($p=0.008$ e $p=0.005$, respectivamente) com diferença significativa para débito cardíaco nos dias de gestação 14 ($18,81 \pm 1,02$ mL/min contra $24,55 \pm 0,42$ do *Pgf^{+/+}*) e 16 ($15,92 \pm 0,94$ mL/min contra $24,06 \pm 0,82$ do *Pgf^{+/+}*) (Figura 4A) e para o volume sistólico no dia de gestação 16 ($36,87 \pm 2,1$ mL contra $47,15 \pm 2=1,9$ mL) (Figura 4B). Os resultados relacionados à função cardíaca sugerem que o PGF contribui para a adaptação do sistema cardiovascular durante a gestação de camundongos.

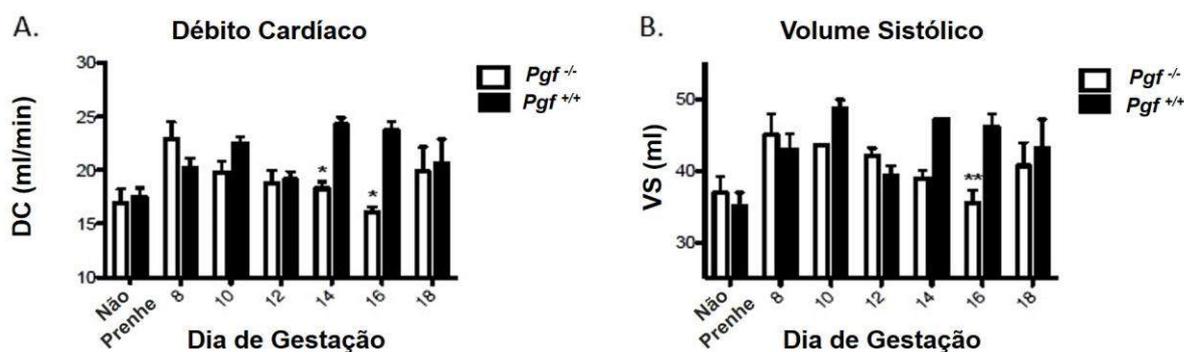


Figura 4 - Função sistólica do coração materno avaliada por ecocardiografia: Análise do débito cardíaco (CD) (A) e volume sistólico (VS) (B).
Fonte: Do autor.

6.3 ANÁLISE ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA CARDÍACA

A avaliação estrutural cardíaca no período pré-gestacional (não prenhes) demonstrou que não existe diferença significativa entre os animais *Pgf^{+/+}* e *Pgf^{-/-}* para o peso do coração e ventrículo esquerdo (normalizados pelo comprimento da tíbia), assim como observado na análise da massa do ventrículo esquerdo por ecocardiografia (Figura 5A-C). Essa última análise (Figura 5A) possibilitou caracterizar o aumento da massa do ventrículo esquerdo durante a gestação dos camundongos do grupo controle como sendo linear (angulação diferente de zero; $p=0,0238$), porém, isso não foi observado nos camundongos *Pgf^{-/-}* (angulação não diferente de zero; $p=0,6465$). Os estudos do coração coletados *post-mortem* nos mesmos períodos de avaliação ecocardiográfica dão suporte a esses resultados. Quando normalizado pelo comprimento da tíbia (Figura 5B), o peso do ventrículo esquerdo dos animais *Pgf^{-/-}* não alterou com o avanço da gestação enquanto que a média do peso do VE nos animais *Pgf^{+/+}* foi maior nos animais gestantes quando comparados a amostragem de animais não prenhes, mesmo sendo estatisticamente não significativa a diferença entre os grupos *Pgf^{-/-}* e *Pgf^{+/+}* (Figura 5B, $p>0.05$) em pontos isolados.

Da mesma maneira, o peso total do coração normalizado pelo comprimento da tíbia aumentou durante a gestação e pós-parto apenas no grupo controle (Figura 5C). A ausência do PGF apresentou um efeito sobre o peso total do coração dos camundongos sendo este mais pesado quando comparado com o

grupo controle (Figura 5C) no período pré-gestacional, gestacional e pós-parto ($p=0.049$), sugerindo que os camundongos *Pgf^{-/-}* falham no processo de adaptação cardiovascular sob o desafio hemodinâmico gestacional. A análise de pontos específicos durante a gestação, para essa amostragem, não apresentou diferença significativa.

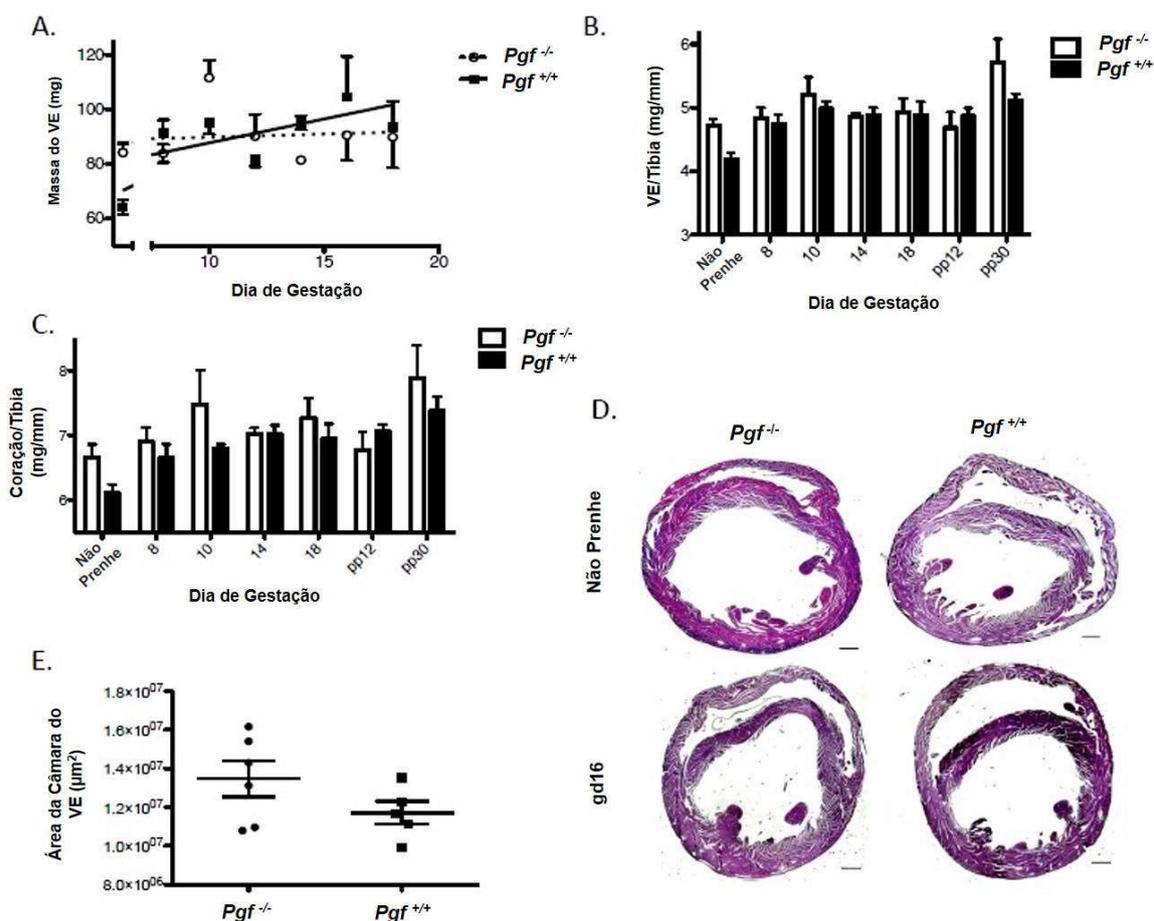


Figura 5 - Análise estrutural cardíaca: massa do ventrículo esquerdo (VE) determinada por ecocardiografia (A). O peso total do VE (B) e peso total do coração (C) foram normalizados pelo comprimento da tíbia. Imagens representativas de cortes histológicos (coloração: H&E) de coração (D). A análise morfométrica do tamanho da câmara do ventrículo esquerdo (E). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Escala = $500\mu\text{m}$ (D).

Fonte: Do autor.

6.4 ANÁLISE ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA RENAL

No momento da eutanásia nos períodos pré-gestacional, gestacional (DG8, 14 e 18) e pós-parto (dias pós-parto 12 e 30) foi feita a análise do peso total dos rins normalizados pelo comprimento da tíbia (Figura 6A). O peso renal normalizado foi maior ($p=0,0442$) nos camundongos *Pgf^{-/-}* (0,0175g/mm) quando comparados com *Pgf^{+/+}* (0,0159g/mm) de maneira geral, no entanto, em pontos específicos estudados, para essa amostragem, só houve diferença significativa no período de 30 dias pós-parto ($p=0.047$) sendo maior no grupo *Pgf^{-/-}* (0.0190 g/mm) comparado com o grupo controle (0.0157 g/mm).

O Índice de Resistência da artéria renal foi utilizado para medir a impedância vascular. A ausência de PGF parece não alterar o IR da artéria renal sendo similar, de modo geral, ao observado no grupo controle ($p=0,084$), a similaridade entre a IR em pontos específicos analisados também ocorreu (Figura 6B).

A análise histológica renal realizada apresentou diferenças morfológicas entre os camundongos dos dois grupos experimentais no período pré-gestacional e final da gestação (DG16). Foi observado hiper celularidade glomerular nos camundongos *Pgf^{-/-}* (36 ± 1 células/glomérulo) quando comparados com o observado em camundongos *Pgf^{+/+}* (27 ± 1 células/glomérulo) no DG16. Também pôde ser observada a expansão da matriz mesangial nos glomérulos renais desses animais (Figura 6C). A mensuração do espaço de Bowman apresentou-se menor ($p<0,001$) nos camundongos depletados para PGF ($0,2\pm 0,02$ pixels) quando comparados com camundongos controle ($1,2\pm 0,1$ pixels).

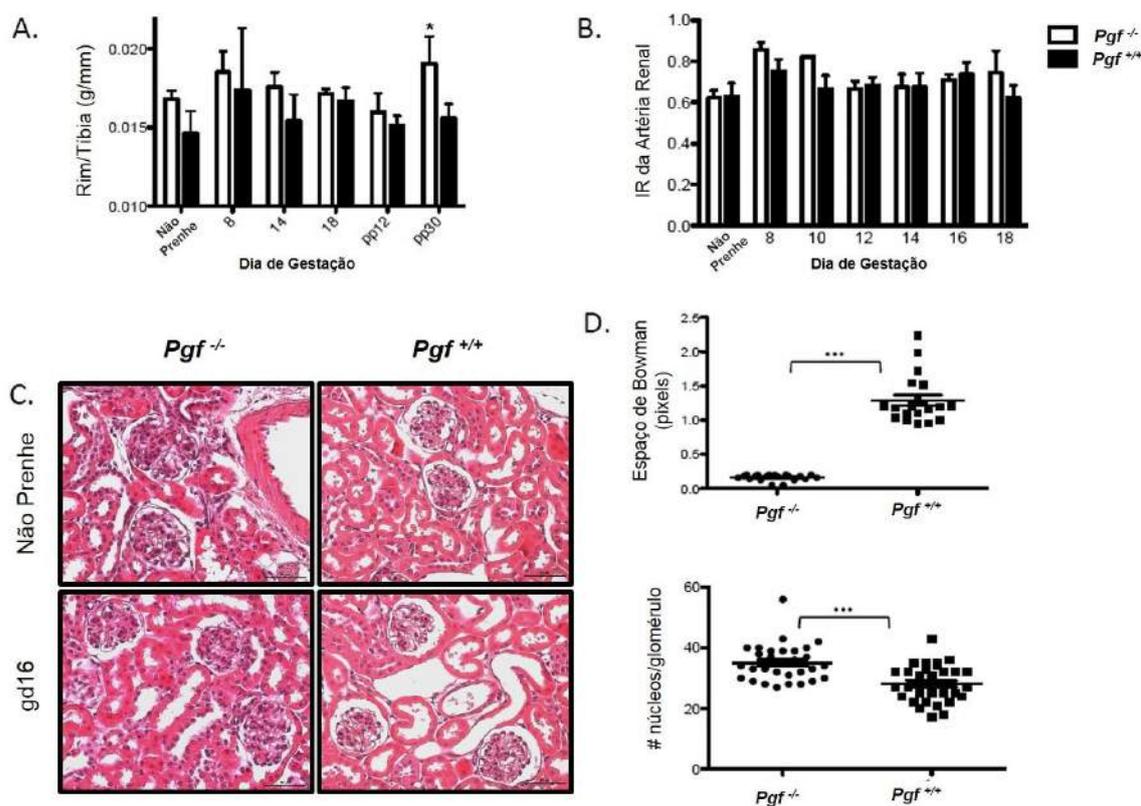


Figura 6 - Peso total do rim normalizado pelo comprimento da tibia (A). Índice de resistência renal (IR) calculado pelo pico sistólico arterial renal (PSAR) e velocidade diastólica final (VDF) [IR= (PSAR-VDF)/PSAR] para ambos os grupos experimentais (B). Imagens histológicas renais de ambos os grupos experimentais nos períodos pré-gestacional e gestação tardia corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) (C). Mensuração do espaço de Bowman e número de células por glomerulo (D). Escala=50 μ m (C). *P \leq 0.05, ***P \leq 0.0001.

Fonte: Do autor.

6.5 EXPRESSÃO DE GENES NO VENTRÍCULO ESQUERDO

Em amostras de tecido do ventrículo esquerdo de ambos os grupos experimentais e para os períodos pré-gestacional (não prenhe) e gestacional (DG8 e DG14), foi realizada a análise da expressão gênica para Endogлина (*Eng*), Óxido Nítrico Sintase 3 (*Nos3*) e Óxido Nítrico Sintase 2 (*Nos2*) relativa à expressão do gene controle Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (*GAPDH*).

A expressão relativa de *Nos3* e *Nos2* foi maior (p=0,009 e p=0,009, respectivamente) nas amostras de ventrículo esquerdo de animais *Pgfl^{-/-}* quando comparada às obtidas dos animais *Pgfl^{+/+}* no DG8, enquanto que a expressão

relativa de *Eng* não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais em nenhum período analisado (Figura 7A-C).

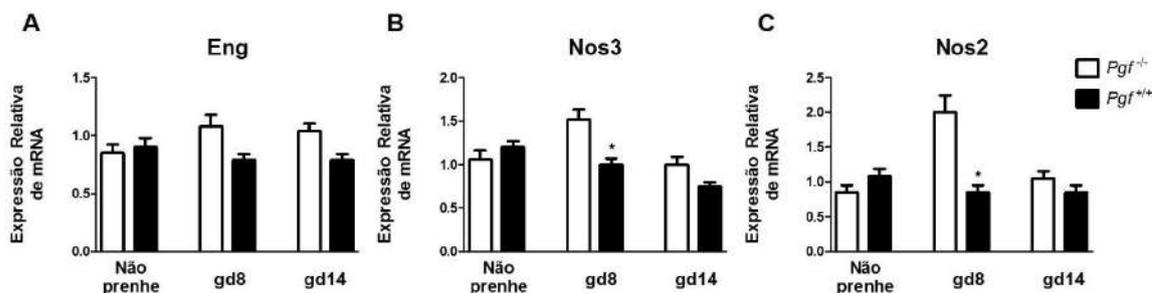


Figura 7 - Avaliação da expressão dos genes para Endogлина, NOS3 e NOS2 (A-C) no ventrículo esquerdo de animais *Pgfl^{-/-}* e *Pgfl^{+/+}* nos períodos pré-gestacional, DG8 e DG14. * $P \leq 0.05$.

Fonte: Do autor.

6.6 MOLDAGEM VASCULAR COM POLÍMERO

Complicações cirúrgicas em camundongos *Pgfl^{-/-}* não haviam sido reportadas anteriormente na literatura. Portanto, uma falha de 80% na taxa de recuperação pós-cirúrgica do procedimento de implantação do *probe* de telemetria na carótida comum desses animais sugere que a depleção de *Pgfl* em camundongos C57BL6/6J pode estar relacionada com complicações vasculares.

Dessa maneira, foi realizada a moldagem vascular com polímero para avaliar possíveis anomalias estruturais no sistema vascular dos animais *Pgfl^{-/-}* com principal atenção aos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro. Como demonstrado na figura 8, a vascularização cerebral de camundongos *Pgfl^{-/-}* tanto de machos (Figura 9B) quanto de fêmeas (Figura 8D) apresentam interações vasculares desorganizadas quando comparadas com camundongos *Pgfl^{+/+}* (Figura 8A e 8C, machos e fêmeas respectivamente). As ramificações vasculares se apresentam com ramos menos delicados prejudicando a formação do círculo arterial cerebral também conhecido como Círculo de Willis (seta na Figura 8). A ocorrência de um Círculo de Willis incompleto pode ser responsável pelos sintomas semelhantes a um acidente vascular cerebral quando ocorre oclusão da artéria carótida durante a implantação do transdutor de telemetria.

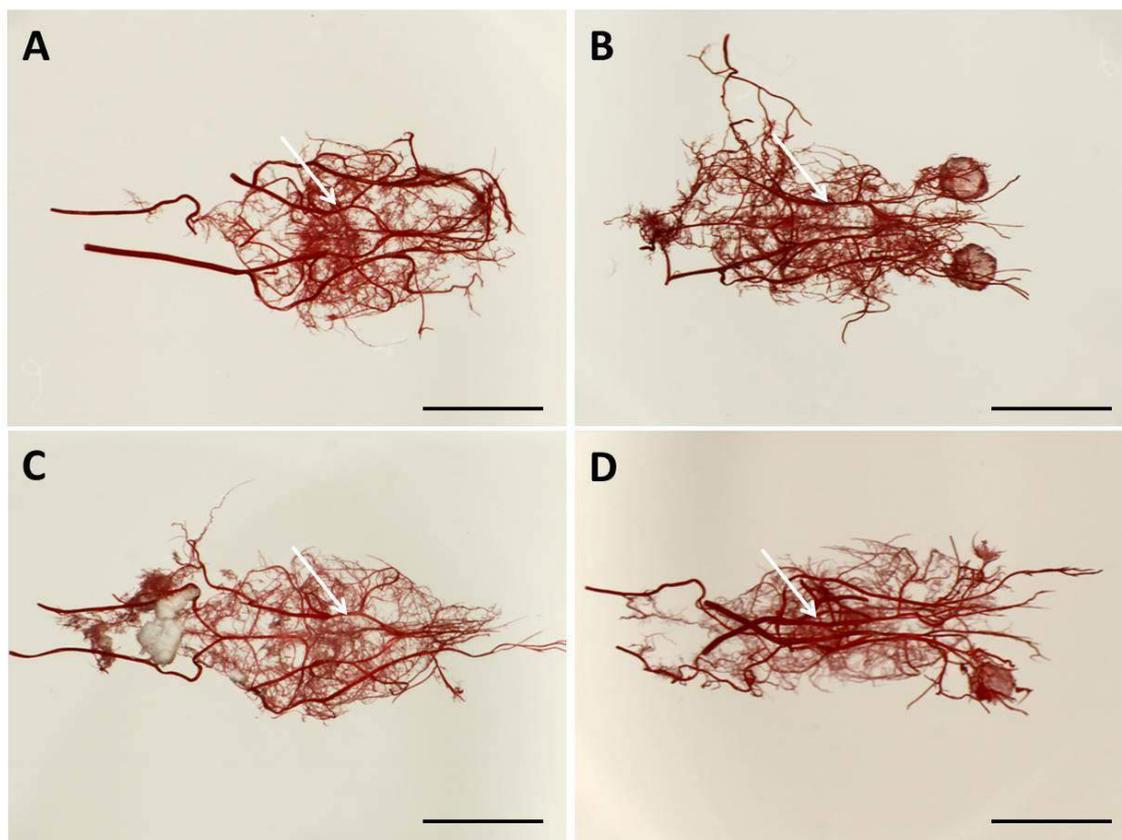


Figure 8 - Moldagem vascular com polímero para identificação da vascularização cerebral de animais $Pgf^{+/+}$ machos (A) e fêmeas (C), e $Pgf^{-/-}$ machos (B) e fêmeas (D). Notar que o Círculo de Willis apresenta-se completo e organizado em animais $Pgf^{+/+}$ diferente do observado em animais $Pgf^{-/-}$ (setas brancas). Escala representa 1cm.

Fonte: Do autor.

6.7 ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

Para verificar se a deficiência vascular cerebral observada em camundongos $Pgf^{-/-}$ poderia refletir em alterações funcionais do cérebro, testes comportamentais foram realizados em $Pgf^{+/+}$ e $Pgf^{-/-}$. No Teste de Suspensão Pela Cauda não foi possível observar diferença significativa no número de episódios imóveis comparando os dois grupos experimentais (Figura 9A), no entanto, diferença significativa ($p=0,009$) foi observada no parâmetro relacionado ao tempo total imóvel (Figura 9B), sendo que os animais $Pgf^{-/-}$ permaneceram mais que o dobro do tempo imóveis ($149,8 \pm 18,64$ segundos) comparados com os animais $Pgf^{+/+}$ ($64 \pm 14,71$ segundos). Outra diferença observada foi com relação ao tempo de latência

para o primeiro evento imóvel sendo maior ($p=0,009$) nos animais $Pgf^{+/+}$ ($73,8 \pm 10,25$ segundos) comparado com os animais $Pgf^{-/-}$ ($33,6 \pm 4,77$ segundos).

O desempenho dos animais $Pgf^{-/-}$ no Labirinto em Y foi menos eficiente quando comparado com os animais $Pgf^{+/+}$ uma vez que a performance de alternâncias espontâneas bem-sucedidas foi melhor ($p=0,009$) nos animais $Pgf^{+/+}$ (porcentagem de $89,17 \pm 3,19$) quando comparada com os animais $Pgf^{-/-}$ (porcentagem de $47,40 \pm 2,88$).

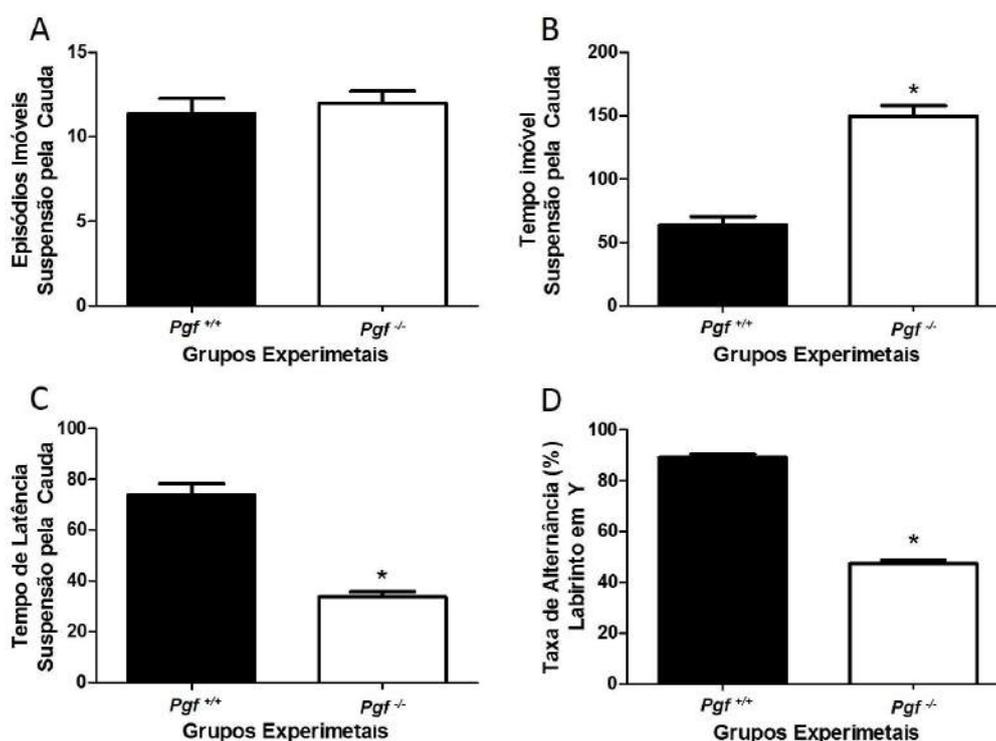


Figura 9 - Estudos comportamentais realizados em camundongos machos $Pgf^{+/+}$ e $Pgf^{-/-}$, os quais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda para avaliação de parâmetros relacionados à depressão, tais como número de episódios de imobilidade (A), tempo total imóvel (B), e o tempo de latência para o primeiro evento de imobilidade (C). Adicionalmente os camundongos foram submetidos ao teste do labirinto-Y para avaliar parâmetros relacionados à memória espacial como por exemplo a taxa de alternância (D). * $p < 0,05$.

Fonte: Do autor.

7 DISCUSSÃO

A deficiência nos níveis de PGF circulantes durante a gestação está associada ao desenvolvimento de complicações hipertensivas como a Pré-eclâmpsia, principalmente em seu quadro inicial (POWERS et al., 2010). A única forma existente até o momento para impedir o desenvolvimento dessa complicação gestacional é a interrupção da gestação induzindo o parto prematuro para a expulsão da placenta (POWERS et al., 2010). Porém, deve-se levar em conta que esse procedimento gera outras complicações para mãe e principalmente para o feto.

Mulheres que vivenciam a pré-eclâmpsia apresentam elevados riscos (de 3 a 4 vezes) de desenvolverem complicações cardiovasculares futuras (GHOSSEIN-DOHA et al., 2013). Além disso, essa complicação parece afetar também o sistema cardiovascular dos filhos (TENHOLA et al., 2006; KVEHAUGEN et al., 2011).

O presente trabalho evidencia o papel regulatório do fator de crescimento placentário na adaptação cardiovascular e renal durante a gestação de camundongos, bem como o impacto que a ausência do PGF acarreta para a vascularização cerebral dos filhotes tendo consequências comportamentais.

Durante a gestação normal de mulheres, os níveis plasmáticos de PGF apresentam um comportamento oscilatório. Sendo detectado na quinta semana de gestação, os níveis plasmáticos de PGF começam a aumentar de maneira linear a partir da décima semana de gestação alcançando níveis mais altos entre a 29^a e 33^a semana de gestação. A partir desse momento os níveis de PGF passam a diminuir até alcançarem valores similares aos observados na parte final do terceiro trimestre gestacional (LEVINE et al., 2004; TAYLOR et al., 2003).

O PGF, em sua maioria, tem origem trofoblástica (VRACHNIS et al., 2013; WELCH et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que este fator, produzido por células fetais, podem atuar no organismo materno; e que altos níveis de PGF plasmático podem proporcionar mecanismos protetores permitindo a adaptação fisiológica, em detrimento da adaptação patológica, do sistema cardiovascular materno para o desafio hemodinâmico gestacional.

Os níveis do fator de crescimento placentário não puderam ser detectados no plasma de camundongos não prenhes. Durante a gestação, foi observado que os níveis de PGF flutuam em um padrão similar ao encontrado em humanos, porém de maneira comparativamente mais avançada, alcançando o pico no DG10 que é considerado o período mediano da gestação (TAYADE et al., 2007). Os níveis desse fator passam a diminuir sendo que no final da gestação (DG18) alcançam valores similares à fase final do primeiro terço gestacional (DG8) de maneira similar ao observado em humanos (LEVINE et al., 2004; TAYLOR et al., 2003).

Os eventos patogênicos que culminam com a apresentação clínica da pré-eclâmpsia e a indução das sequelas pós-parto podem estar relacionadas com os níveis de PGF plasmático (DAVIS et al., 2012; McDONALD et al., 2013; RAY et al., 2012; TUOVINEN et al., 2013). Dessa maneira, o presente trabalho teve como um dos objetivos avaliar se a depleção genética de *Pgf* reflete em complicações cardiovasculares tendo como consequência dificuldade na manutenção dos padrões de pressão arterial esperados durante a gestação de camundongos.

Apesar de ser bem compreendido e detalhado na literatura que a pressão arterial materna diminui em meados da gestação tanto em humanos como em camundongos (BURKE et al., 2010; GRINDHEIM et al., 2012; OCHSENBEIN-KOLBLE et al., 2004), os mecanismos pelos quais essas alterações hemodinâmicas ocorrem ainda não são completamente esclarecidos.

Estudos demonstraram a ocorrência de queda da pressão arterial média em períodos medianos da gestação de camundongos (BURKE et al., 2010), porém o presente trabalho demonstrou que camundongos *Pgf*^{-/-} apresentam queda prolongada e mais sustentada da pressão arterial média por radiotelemetria, bem como da pressão sistólica por pletismografia de cauda no mesmo período e as razões pelas quais esse fenômeno ocorre são ainda menos esclarecidas, sobretudo levando em consideração que a queda do PGF na gestação de humanos está associada à pressão elevada de maneira patológica (POWERS et al., 2012; TORRY et al., 1998).

Em um estudo detalhado da pressão arterial média materna durante a gestação, Macdonald-Wallis e colaboradores (2012) descobriram que as mulheres que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia exibiram aumento da pressão arterial em período precoce da gestação e, após à 30^a semana gestacional a

pressão arterial média se elevou de maneira mais acentuada (MACDONALD-WALLIS et al., 2012). Entretanto, comparando a taxa de mudança da pressão arterial média pelo tempo, mulheres normotensas e aquelas que posteriormente exibiam quadro de pré-eclâmpsia apresentavam taxa quase indistinguível até a 30ª semana, e apenas após esse período que essa taxa se tornou significativamente maior nas mulheres com gestação de pré-eclâmpsia (MACDONALD-WALLIS et al., 2012).

Os camundongos *Pgf^{-/-}* exibiram padrão similar aos achados por Macdonald-Wallis e colaboradores (2012) em mulheres que apresentaram a complicação gestacional de pré-eclâmpsia, uma vez que a pressão arterial média inicial (pré-gestacional) e encontrada no período inicial da gestação (pré-implantacional) era maior nesses animais quando comparado com o controle, exibindo um declínio no período gestacional mediano. Dessa maneira, o presente estudo revela um papel importante do PGF na regulação da pressão arterial média, sobretudo na recuperação da MAP após a fase de queda pós-implantacional (fase 2), se mantendo elevada nos animais depletados para *Pgf* no período gestacional tardio com grandes semelhanças ao observado em casos de PE em humanos.

As diferenças na pressão sistólica materna entre grupos, bem como as diferenças nos padrões de flutuação de pressão no período gestacional pela pré-gestacional também pode refletir no papel que o PGF exerce na remodelação cardíaca causada após o desafio hemodinâmico gestacional.

As flutuações nos níveis de PGF parecem estar relacionadas de maneira coordenada com as variações morfofuncionais cardíacas observadas durante a gestação de camundongos normais. Foi observado o aumento da pressão sistólica na última fase da gestação (fase 4: DG15-18) em camundongos *Pgf^{-/-}* quando comparados com os camundongos do grupo controle. Esta fase representa o período subsequente ao período onde são observados os níveis mais elevados de PGF circulante na gestação de camundongos normais (DG10).

Como demonstrado no presente trabalho, anteriormente ao coito o coração dos animais *Pgf^{-/-}* não apresentavam diferenças em nenhum parâmetro analisado. Este dado dá suporte aos achados da literatura que demonstram que camundongos *Pgf^{-/-}*, sem nenhum tratamento ou desafio hemodinâmico, não apresentam alterações morfológicas cardíacas (ACCORNERO et al., 2011). Durante a gestação, a diferença funcional mais expressiva entre camundongos

Pgf^{-/-} e *Pgf^{+/+}* foi com relação ao Débito Cardíaco e Volume Sistólico, ocorrendo entre o DG14 e DG16 caracteriza o período subsequente ao pico de PGF observado na fase mediana da gestação. Essa relação nos leva a crer que existe um período de latência entre o pico de PGF e a resposta fisiológica de aumento de DC e VS, e, mais do que isso, a falta de PGF representa um déficit da resposta fisiológica e de adaptação cardíaca na fase gestacional tardia.

E, dessa maneira, o presente trabalho postula que as diferenças na função cardíaca entre os grupos experimentais observadas nos DG14 e DG16, que se tornam nítidas dias após ao período onde o PGF plasmático deve apresentar níveis elevados (DG10), causa consequências CVs sistêmicas como alterações na pressão arterial e sistólica no período gestacional tardio (fase 4). As fêmeas *Pgf^{-/-}* também apresentaram queda precoce e mais prolongada da pressão arterial e sistólica, bem como uma incapacidade de recuperar esses parâmetros a níveis próximos aos anteriores à queda quando comparadas com as fêmeas do grupo controle. Esse evento sugere um atraso na capacidade das fêmeas em garantir a perfusão adequada dos embriões no período mediado gestacional, além de representar um novo papel do PGF nesse processo de recuperação da MAP que é observado tanto em camundongos quanto em humanos durante a gestação (BURKE et al., 2010; GHOSSEIN-DOHA et al., 2013).

É interessante observar que existe diferença ao comparar a pressão sistólica dos animais de ambos os grupos experimentais no período inicial da gestação (fase 1: DG0-5). Já foi demonstrado que durante a gestação, os níveis plasmáticos de PGF são inversamente proporcionais à pressão arterial materna (KASDAGLIS et al., 2010). Esta hipótese está de acordo com os achados do presente trabalho, onde os animais controle apresentam maior pressão sistólica na fase 1, sendo este o momento de menor concentração plasmática de PGF durante a gestação e, a total ausência de PGF nos animais depletados resulta em pressão arterial significativamente maior do que a observada nos animais controle. Os achados não apenas estão de acordo com os dados da literatura, como também trazem a concepção da importância do PGF no sistema cardiovascular materno e na regulação da pressão arterial até mesmo no período inicial da gestação.

O estresse cardiovascular induzido pela gestação apresenta similaridades a outros estressores do sistema CV, como por exemplo a pressão excessiva ou infarto do miocárdio (IWASAKI et al., 2011; CARNEVALE e LEMBO, 2012;

ACCORNERO et al., 2011; IWAMA et al., 2006; GMEINER et al., 2011). Nessas condições, a administração de PGF ou a superexpressão desse fator é capaz de reduzir a incidência de falha cardíaca, bem como o índice de mortalidade aumentando a capacidade de recuperação do organismo pelo aumento da angiogênese no coração e pela promoção da hipertrofia cardíaca adaptativa (IWASAKI et al., 2011; CARNEVALE; LEMBO, 2012; ACCORNERO et al., 2011; IWAMA et al., 2006; GMEINER et al., 2011; JABA et al., 2013; GIGANTE et al., 2006). A análise estrutural comparativa do coração entre os grupos experimentais durante a gestação revelou similaridades fenotípicas entre os animais depletados para *Pgf* deste trabalho e animais com que sofreram estresse por pressão excessiva relatados na literatura. As alterações cardíacas podem ir além da anatômica/morfológica, uma vez que a expressão gênica em tecido cardíaco também se demonstra alterada em situações de estresse e durante o processo de reparo tecidual (ZHANG et al., 2011; BROSENS et al., 2011). Entre estes, destacam-se os genes para Peptídeo Natriurético Atrial e do sistema Oxido Nítrico Sintase que estão envolvidos em processos de cardioproteção, resposta hipertrófica, vasodilatação e angiogênese; sendo estas, funções que se sobrepõe às do PGF (JONES et al., 2004; MANOURY et al., 2012; JABA et al., 2013; ROMERO et al., 2013).

De maneira similar ao observado no presente trabalho envolvendo a depleção de PGF, a depleção de NOS acentua a injúria e prejudica o prognóstico após infarto/reperfusão do miocárdio (JONES et al., 2004). A enzima NOS3 (ou eNOS) é um produto derivado de ambos VEGF e PGF em respostas hipertróficas e angiogênicas (JABA et al., 2013; GIGANTE et al., 2006). Como demonstrado por Jaba e colaboradores (2013) a superexpressão gênica de *Pgf* aumenta a expressão de *Nos3*, bem como a produção de NO, que são fundamentais para desencadear a resposta de hipertrofia dos cardiomiócitos. No presente trabalho foi postulado que o coração de animais *Pgf^{f/-}* pode apresentar a expressão gênica de *Nos3* aumentada por um mecanismo independente de PGF, com o objetivo de compensar a falta de *Nos3* induzido por este fator, já que ambos (NOS3 e PGF) promovem a hipertrofia adaptativa de maneira cardioprotetora; entretanto, *Nos3* (via NO) também apresenta importante função vasodilatadora. Esse fato nos leva a crer que o desenvolvimento de uma hipertrofia mais decorrente de dilatação vascular ocorre no coração de animais *Pgf^{f/-}*. Muito parecido com NOS3, a enzima

NOS2 tem efeitos cardioprotetores (GUO et al., 1999) e o aumento dos níveis de NOS2 pode ser decorrente de um efeito compensatório em um coração hipertenso (OTANI, 2009). Possivelmente a exagerada oscilação da pressão arterial durante a gestação em camundongos *Pgf^{-/-}* e a reduzida capacidade de recuperação da pressão arterial média no período mediano da gestação pode contribuir para a expressão alterada de *Nos2* observada no presente estudo, sendo esta expressão maior sobretudo no período de fase 2 e 3.

O Fator de Crescimento Placentário, assim como o VEGF, está relacionado com os rins e seu desenvolvimento, uma vez que podócitos glomerulares expressam PGF e, além disso, existe uma relação entre esse fator e a filtração glomerular, sendo que baixos níveis de PGF durante a gestação, como observado durante a PE, estão em sua maioria associados à proteinúria (TJWA et al., 2003). Foi observado neste trabalho que houve hipertrofia renal em camundongos não prenhes, durante a gestação e no período pós-parto. Também foi observado a ocorrência e hiperplasticidade e reduzido espaço urinário (Espaço de Bowman) apenas nos rins de camundongos *Pgf^{-/-}*, sendo que a diferença desses parâmetros estava exacerbada durante a gestação. A ocorrência de programação fetal em um ambiente deficiente de PGF pode contribuir para o fenótipo renal alterado de camundongos fêmeas virgens. A presença de pressão sistólica elevada durante a gravidez precoce e tardia nos camundongos *Pgf^{-/-}* poderia contribuir ou resultar da hipertrofia renal observada durante a gravidez, em comparação ao grupo controle.

Está bem demonstrado na literatura por Carmeliet et al. (2001) e Ziche et al. (1997) que o PGF exerce função no desenvolvimento normal de vasos sanguíneos e as anormalidades vasculares observadas em camundongos *Pgf^{-/-}* não se limitam à observadas na placenta ou decida basal como já constatado por outros trabalhos na literatura (CARMELIET et al., 2001; GAAL et al., 2013).

A perfusão vascular com polímero demonstrou que a vascularização cerebral é deficiente na ausência de PGF demonstrando desorganização e falhas em conexões, bem como a ocorrência de formação incompleta do Círculo de Willis. Vale ressaltar que o presente trabalho não teve como objetivo demonstrar quando as alterações na vascularização ocorrem durante o desenvolvimento, no entanto outros autores relataram que o desenvolvimento da rede vascular cerebral em camundongos *Pgf^{+/+}* inicia por volta do DG12 concluindo no DG15 (YANG et al., 2013). Estes mesmos autores sugerem que a sinalização por NOTCH é essencial

para esse processo (YANG et al., 2013). Outros estudos relacionados à angiogênese demonstraram que a ativação de NOTCH potencializa a expressão de PGF que, por sua vez, se liga ao VEGFR1 (FUNAHASHI et al., 2010), porém a participação do PGF no desenvolvimento do Círculo de Willis jamais havia sido descrito na literatura.

Filhos nascido de gestação que tiveram a complicação da PE apresentam índices mais elevados de ocorrência de acidente vascular cerebral, capacidade cognitiva reduzida e incidência de depressão sendo este último mais comum em homens do que mulheres (GALLAGHER et al., 2013; HAKIM et al., 2013; KAJANTIE et al., 2009), sendo que uma proporção significativa destas gestações teria sido deficiente em PGF (POWERS et al., 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho, com relação aos dois testes comportamentais distintos realizados, sugerem a ocorrência de disfunção cognitiva em camundongos *Pgf^{-/-}* adultos, bem como prevalência de comportamento similar à depressão e déficit de memória espacial nesses animais quando comparados com os PGF competentes.

Enquanto muitas pesquisas estão voltadas para estudos epigenéticos como sendo a base da indução de alterações no sistema nervoso central em decorrência de gestações de PE, o presente trabalho demonstra alterações anatômicas até então não relatadas que podem representar um importante avanço nessa linha de pesquisa. Porém, vale ressaltar que mais estudos serão necessários para definir a exata relação da PE e do PGF, bem como o papel desse fator no desenvolvimento vascular cerebral que pode ser estudado, por exemplo, como sugerido por Fantin e colaboradores (2013) utilizando a técnica de *Whole Mount* no período mediano da gestação (DG10).

A pré-eclâmpsia é uma síndrome complexa que envolve a participação exacerbada de fatores pro-inflamatórios bem como anti-angiogênicos, sendo este primeiro também associado à deficiência em funções cognitivas na prole devido ao comprometimento da neurogênese (GALLAGHER et al., 2013). Exemplificando, a Interleucina 6 (IL6) materna, um fator que se encontra elevado em gestações de PE, é capaz de percorrer pelos vasos sanguíneos fetais e atravessar a barreira hematoencefálica (PRINS et al., 2012; SMITH et al., 2007). Com isso, este pode exercer papel na neurogênese e/ou vasculogênese fetal. Em camundongos, a administração de IL6 no DG14 causa alterações nas células tronco neurais e induz

alterações a longo prazo na neurogênese, levando a quadros de comportamento relacionados à esquizofrenia (GALLAGHER et al., 2013; SMITH et al., 2007).

Raros estudos de fluidos fetais humanos sugerem que as concentrações PGF no feto durante o primeiro trimestre (idade mediana de 8,3 semanas) são semelhantes às do plasma materno podendo ser estimada a produção de PGF pelo trofoblasto (MAKRYDIMAS et al., 2008). O que ainda é desconhecido na literatura atualmente é se o PGF derivado da placenta é capaz de alcançar a circulação fetal de humanos ou camundongos, e se a baixa produção placentária de PGF está relacionada com a baixa produção PGF por tecidos fetais não derivados do trofoectoderme do blastocisto. Também não se sabe se o PGF produzido por outros órgãos e encontrado no líquido amniótico pode apoiar o desenvolvimento vascular cerebral, ou então, se a administração de PGF durante o desenvolvimento do conceito, ou à recém-nascidos logo após o parto, pode normalizar a vascularização cerebral e as funções cognitivas anormais associadas à gravidez deficiente em PGF.

Portanto, o presente trabalho associa alterações hemodinâmicas e morfofuncionais cardiovasculares durante a gestação de camundongos deficientes em PGF com consequências na adaptação cardíaca bem como na vascularização cerebral com implicações comportamentais.

O presente trabalho, pela primeira vez, esclareceu funções ainda desconhecidas do Fator de Crescimento Placentário durante a gestação normal, bem como sua importância em situações de complicações gestacionais que envolvem o sistema cardiovascular. Este estudo também quebra paradigmas a respeito do PGF, evidenciando que se trata de um fator importante para o desenvolvimento fetal e que participa da regulação fisiológica do controle da pressão arterial não apenas no período final da gestação, como acreditava-se até o momento em função da caracterização de síndromes hipertensivas como a pré-eclâmpsia, mas também sua crítica participação como cardioprotetor no período mediano da gestação onde o sistema cardiovascular é demasiadamente exigido, uma vez que representa o período onde ocorrem eventos fundamentais como o remodelamento vascular com grande importância na manutenção do fluxo sanguíneo adequado para o feto em desenvolvimento.

O ineditismo dos resultados referente à vasculogênese cerebral e a deficiência na formação de estruturas vasculares cerebrais quando na carência de

PGF aponta uma interessante relação entre o alto índice de depressão, e outros problemas psicossociais, e filhos de gestação que apresentaram a complicação de pré-eclâmpsia, representando um importante avanço nessa área de pesquisa.

Os prejuízos decorrentes da falta do PGF durante a gestação demonstraram ir além dos sintomas da complicação gestacional de hipertensão simultâneos a esse evento, ou seja, o PGF parece ser imprescindível não apenas para a momentânea adaptação fisiológica gestacional, mas também para prevenir adaptações patológicas que poderiam ter como consequência, problemas cardíacos e renais na mãe e no feto, bem como problemas psicossociais na prole durante a vida adulta.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos referentes aos estudos de dois modelos de camundongos durante a gestação: I. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica x Nimesulida; II. Deficiência de Fator de Crescimento Placentário; permitiu-nos concluir que:

a) a inflamação sistêmica induzida por LPS foi capaz de, depois de 2h, alterar o padrão normal de marcação das células uNK DBA⁺ no período mediano da gestação, de tal forma que se fez necessária a inclusão de uma nova classificação: células NK alteradas (alt-uNK);

b) as alterações morfológicas observadas nas células uNK DBA⁺ em camundongos que receberam injeção de LPS foram reduzidas drasticamente pelo pré-tratamento com Nimesulida;

c) a administração de LPS causa mobilização das células uNK DBA⁺, resultando em influxo exacerbado do subtipo imaturo (subtipo1) no miométrio da região mesometrial dos sítios de implantação embrionária no DG10 (região1);

d) o influxo exacerbado do subtipo 1 na região 1 dos sítios de implantação embrionária de camundongos tratados com LPS foi prevenido pelo pré-tratamento com Nimesulida;

e) os subtipos de células uNK DBA⁺ mais responsivos ao desafio inflamatório causado pelo LPS foram os subtipos mais diferenciados (subtipos 3 e 4), reduzindo em número, ao passo que a quantidade de células uNK DBA⁺ alteradas aumentava;

f) tanto a diminuição do número de células uNK DBA⁺ dos subtipos 3 e 4 quanto o aumento das células uNK DBA⁺ alteradas puderam ser impedidos pela inibição prévia de COX-2;

g) o LPS causou diminuição da expressão de α -actina na musculatura lisa dos vasos sanguíneos do útero, concomitante à redução da espessura da parede dos vasos e dilatação do lúmen. Sendo que estes eventos puderam ser evitados pela inibição de COX-2;

h) A inflamação sistêmica induzida pelo LPS resulta em liberação de perforina pelas células uNK, por um mecanismo de ativação onde a enzima COX-2 parece estar envolvida;

i) a eficácia do modelo de indução de inflamação por LPS em camundongos prenhes (DG10) pôde ser confirmada pelo estabelecimento do comportamento semelhante à ansiedade, o qual parece ocorrer por uma via independente de COX-2;

j) a administração de LPS causa perda fetal considerável, e o pré-tratamento com Nimesulida agrava esse quadro; sugerindo que as alterações fisiológicas após a inflamação induzida por LPS são COX-2 dependentes e de fundamental importância para o restabelecimento da homeostase do útero, a fim de manter a gestação a termo;

k) os níveis plasmáticos do Fator de Crescimento Placentário oscilam durante a gestação alcançando níveis máximos por volta do DG10;

l) a deficiência de PGF prejudica a pressão arterial média e sistólica, medidas respectivamente por radiotelemetria e pletismografia durante o período gestacional. Sendo que esses parâmetros apresentam queda mais acentuada e mais sustentada no período mediano da gestação e aumento no período final da gestação;

m) também no período mediano da gestação o PGF parece ser importante para a manutenção da função cardíaca nos parâmetros de Débito Cardíaco e Volume Sistólico;

n) a ausência de PGF limita a adaptação morfológica cardíaca e renal frente ao desafio hemodinâmico gestacional, principalmente no ganho em massa do ventrículo esquerdo e na dilatação do espaço de Bowman nos corpúsculos renais;

o) a expressão de genes como *Nos3* e *Nos2*, envolvidos em processos cardioprotetores, aumenta por volta do DG8 em camundongos deficientes em PGF;

p) a deficiência de PGF prejudica a vasculogênese cerebral de filhotes com desorganização e falhas em conexões, bem como a ocorrência de formação incompleta do Círculo de Willis. Tamanha é sua importância que a deficiência na

vasculogênese cerebral apresenta consequências comportamentais nesses animais.

REFERÊNCIAS

- AASA, K. L. et al. Analysis of maternal and fetal cardiovascular systems during hyperglycemic pregnancy in the nonobese diabetic mouse. **Biol Reprod**, v. 88, p.151, 2013.
- ACAR, N., USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine Natural Killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: A review. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 82-91, 2011.
- ACCORNERO, F. et al. Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. **Circ Res**, v. 109, p. 272-280, 2011.
- ASHKAR, A. A.; CROY, B. A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.** v. 61, p. 493-502, 1999.
- ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine Natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.** v. 192, p. 259-570, 2000.
- ASHKAR A. A. et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol.** v. 171, p. 2937–2944, 2003.
- AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 64, n.4, p.787-796, 1999.
- BASSI, G. S. et al. Lipopolysaccharide-induced sickness behavior evaluated in different models of anxiety and innate fear in rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v.110, n.4, p.359–369, 2012.
- BAUER, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, p. 812–822, 2004.
- BAUME D. M. et al. Differential response to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. **Eur J Immunol**, v. 1, p. 1-6, 1992.

BERNARD, O. et al. Immunological studies of mouse decidual cells. 1. Membrane markers of decidual cells in the days after implantation. **J. Exp. Med**, v. 148, n. 2, p. 580-591, 1978.

BHUTTA, A. T. et al. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. **JAMA**, v. 288, p. 728-737, 2002.

BORZYCHOWSKI, A. M. et al. Functional analysis of murine uterine Natural Killer cells genetically devoid of estrogen receptors. **Placenta**, v. 24, p. 403-411, 2003.

BREIER, G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. **Development**. v. 114, p. 521-532, 1992.

BRENNAN, J. et al. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by LY49: specificities and domain interactions. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1553-1559, 1996.

BROSENS, I. et al. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 204, p.193-201, 2011.

BROWN, L. F. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J Exp Med**, v. 176 n. 5, p. 1375-1379, 1992.

BULMER, J. N.; LASH, G. E. Human uterine Natural Killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol**, Newcastle, v. 42, p. 511-521, 2005.

BURKE, S. D. et al. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. **Hypertension**, v. 55, p. 729-737, 2010.

BURNETT, T. G.; HUNT, J. S. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5245-5250, 2000.

BURRELL, R. Human responses to bacterial endotoxin. **Circ Shock.**, Morganrown, v. 43, n. 3, p.137-153, 1994.

CARLYLE, J. R. et al. Natural Killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny. **J Immunol**, v. 160, p. 744-753, 1998.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nat Med**, v. 7, p. 575-583, 2001.

CARNEVALE, D.; LEMBO, G. Placental growth factor and cardiac inflammation. **Trends Cardiovasc Med**. v. 22, n.8, p. 209-212, 2012.

CASTRO E. O. et al. Sepsis and septic shock during pregnancy: clinical management. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 30, n. 12, p. 631-638, 2008.

CHANG, J. K.; ROMAN, C.; HEYMANN, M. A. Effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition on the umbilical-placental circulation in fetal lambs in utero. **Am J Obstet Gynecol**, v. 166, p. 727-734, 1992.

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

CONNOLLY, D. T. et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **J Clin Invest**. v. 84, n. 5, p. 1470-1478, 1989.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human killer-cell subsets. **Trends in Immunology**. v. 22, p. 633-640, 2001.

CRAICI, I.; WAGNER, S.; GAROVIC, V. D. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? **Ther Adv Cardiovasc Dis** v. 2, p. 249-259, 2008.

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

CROY, B. A. et al. Uterine Natural Killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. **Am. J. Reprod. Immunol**. v. 37, p. 463-470, 1997.

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

CROY, B. A. et al. Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J Reprod Immunol.**, v. 59, p. 175-191, 2003a.

CROY, B. A. et al. Uterine Natural Killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, v. 126, p. 149-160. 2003b.

CROY, B. A. et al. Analysis of uterine Natural Killer cells in mice. In: CAMPBELL, K. S. **Natural Killer cell protocols**, 2. ed. Totowa, NJ. Humana Press, p. 465–503, 2010a.

CROY, B. A. et al. Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol Biol.**, v. 612, p. 465-503, 2010b.

CRUSE, I.; MAINES, M. D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are the products of different genes. **J Biol Chem**, v. 263, p. 2348–3353, 1988.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 856, p. 132-138, 1998a.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 840, p. 586-590, 1998.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat. Rev. Neurosci.** v.9, n.1, p.46–56, 2008.

DAVIS, E. F. et al. Cardiovascular risk factors in children and young adults born to preeclamptic pregnancies: a systematic review. **Pediatrics** v. 129, p. 1552-1561, 2012.

DE FALCO, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. **Exp Mol Med** v. 44, p.1-9, 2012.

DELGADO, S. R. et al. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a Natural Killer cell population, from the pregnant mouse uterus. **J. Leukoc. Biol.** v. 59, p. 262-169, 1996.

DEWERCHIN, M.; CARMELIET, P. PIGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.1, n.8, p. 2, 2012.

DI SANTO, J. P. Natural Killer cell developmental pathways: a question of balance. **Annu Rev Immunol.**, v. 24, p. 257–286, 2006.

DIWAKAR, L.; RAVINDRANA, T. H. V. Inhibition of cystathionine gamma-lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS. **Neurochem Int.** v. 50, p. 418–426, 2007.

DUDA, D. G.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. **Trends Mol Med.** v. 10, p. 143–145, 2004.

DUNK, C. et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. **Am J Pathol**, v. 156, p. 2185–2199, 2000.

DUNN, A. J. et al. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 891-909, 2005.

ELOVITZ, M. A.; MRINALINI, C. Animal models of preterm birth. **Trends Endocrinol. Metab**, v. 15, p. 479–487, 2004.

ENANGA, B. et al. Sleeping sickness and the brain. **Cell Mol Life Sci. May**, Glasgow, v. 59, n. 5, p. 845-858, 2002.

ERICKSON, K. et al. E. Birth weight and cognitive performance in older women: the Rancho Bernardo Study. **Arch Womens Ment Health**, v. 13, p. 141-146, 2010.

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

ERLEBACHER, A. Leukocyte Population Dynamics and Functions at the Maternal–Fetal Interface. *In* CROY B. A., YAMADA A. T., DEMAYO F. J., ADAMSON S. L. editors. **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**, p. 163-173, 2014.

FANTIN, A. et al. The embryonic mouse hindbrain as a qualitative and quantitative model for studying the molecular and cellular mechanisms of angiogenesis. **Nature protocols**, v. 8, p. 418-429, 2013.

FARRUGIA, G. et al. Activation of whole cell currents in isolated human jejunal circular smooth muscle cells by carbon monoxide. **Am J Physiol**, v. 264, p. G1184–G1189, 1993.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, E. R. et al. Sepsis during pregnancy. **Crit Care Med**, Rochester, v. 33, p. 286-293, 2005.

FRYDMAN, R. B. et al. Specificity of heme oxygenase: a study with synthetic hemins. **Biochem**. v.20, p.5177–5182. 1981.

FUNAHASHI, Y. et al. NOTCH regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. **Journal of Angiogenesis Research**, v. 2, p. 3, 2010.

FUNK C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.

GAAL, E. I. et al. Comparison of vascular growth factors in the murine brain reveals placenta growth factor as prime candidate for CNS revascularization. **Blood**, v. 122, p. 658-665, 2013.

GALE, C. R.; WALTON, S.; MARTYN, C. N. Foetal and postnatal head growth and risk of cognitive decline in old age. **Brain**, v. 126, p.2273-2278, 2003.

GALLAGHER, D. et al. Transient Maternal IL-6 Mediates Long-Lasting Changes in Neural Stem Cell Pools by Dereglating an Endogenous Self-Renewal Pathway. **Cell stem cell**, v. 13, p. 564-576, 2013.

GHOSEIN-DOHA, C. et al. Hypertension after preeclampsia is preceded by changes in cardiac structure and function. **Hypertension**, v. 62, p. 382-390, 2013.

GIGANTE, B. et al. Plgf^{-/-} e Nos^{-/-} mice show defective angiogenesis associated with increased oxidative stress in response to tissue ischemia. **FASEB J**, v. 20, p. 970-972, 2006.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**, 2nd Ed, Sinauer, Sunderland, MA, 1988.

GIULIANI, E. et al. Characterization of Uterine NK Cells in Women with Infertility or Recurrent Pregnancy Loss and Associated Endometriosis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.72, p. 262-269, 2014.

GMEINER, M. et al. Improvement of cardiac function in the failing rat heart after transfer of skeletal myoblasts engineered to overexpress placental growth factor. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 141, p. 1238-1245, 2011.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 1500–1507, 2000.

GRAHAM, C. H. et al. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. **Exp Cell Res**, v. 214, p. 93–99, 1994.

GREGORY, A. L. et al. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. **Placenta**, v. 28, p. S93-S99, 2014.

GRINDHEIM, G. et al. Changes in blood pressure during healthy pregnancy: a longitudinal cohort study. **Journal of hypertension**, v. 30, p. 342-350, 2012.

GU, Y.; LEWIS, D. F.; WANG, Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p. 260-266, 2008.

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

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

GUINN, D. A.; ABEL, D. E.; TOMLINSON, M. W. Early goal directed therapy for sepsis during pregnancy. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 34, p. 459-479, 2007.

GUO, Y. et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, p. 11507-11512, 1999.

HAKIM, J.; SENTERMAN, M. K.; HAKIM, A. M. Preeclampsia Is a Biomarker for Vascular Disease in Both Mother and Child: The Need for a Medical Alert System. **International Journal of Pediatrics**, p. 8, 2013.

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

HARRIS, L. K.; APLIN, J. D. Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy. **Reprod Sci**, v.14, p.28-34, 2007.

HATTORI, K. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. **Nature medicine**, v. 8, p. 841-849, 2012.

HAZAN, A. D. et al. Vascular-eukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro. **Am J Pathol**. v. 177, n. 2, p. 1017-1030, 2010.

HEAD, J. R. Uterine Natural Killer cells during pregnancy in rodents. **Nat. Immun**, v. 15, p. 7-21, 1996.

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

HENDERSON, T. A. et al. Steroid receptor expression in uterine Natural Killer cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, p. 440–449, 2003.

HENRY, C.J., HUANG, Y. et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J. Neuroinflammation**, v. 5, p. 15, 2008.

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

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

HORI, T. et al. Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. **Ann N Y Acad Sci**, v. 917, p. 106-120, 2000.

HOSOKI, R.; MATSUKI, N.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 237, p. 527–531, 1997.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**, v. 348, n. 2, p. 138-150, 2003.

HOVES, S.; TRAPANI, J. A.; VOSKOBOINIK, I. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 2, p. 237-243, 2010.

HUNTER, S.; ROBSON, S. C. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. **Br Heart J**, v. 68, p. 540-543, 1992.

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

IWAMA, H. et al. Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, p. 1559-1567, 2006.

IWASAKI, H. et al. PIGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. **PLoS One**, v. 6, p. e24872, 2011.

JABA, I. M. et al. NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. **J Clin Invest**, v. 123, p. 1718-1731, 2013.

JAKEMAN, L. B. et al. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. **Endocrinology**. v. 133, n. 2, p. 848-859, 1993.

JONES, S. P. et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, p. H276-282, 2004.

JONES, R. K. et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferative activity in human endometrial stroma and endometrial granulated lymphocytes. **Biol Reprod**, v. 58, p. 995–1002, 1998.

KAJANTIE, E. et al. Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study. **Stroke**, v. 40, p. 1176-1180, 2009.

KALKUNTE, S. et al. Evolution of non-citotoxic uterine natural killer (uNK) cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 5, p. 425-432, 2008.

KANEKO Y. et al. L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. **Diabetes**. v. 55, p.1391–1397, 2006.

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

KASDAGLIS, T. et al. Placental growth factor in the first trimester: relationship with maternal factors and placental Doppler studies. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 35, p. 280-285, 2010.

KECK, P. J. et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. **Science**, v. 246, p. 1309-1312, 1989.

KENT, S. et al. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 20, n. 1, p. 171-175, 1996.

KIN, K. J. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v. 362, p. 841-844, 1993.

KING, A.; LOKE, Y. W. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. **Immunol. Today**, v. 12, p. 432-435, 1991.

KING, A.; GARDNER, L.; LOKE, Y. W. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Hum Reprod**, v. 11, p. 1079–1082, 1996.

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

KISO, Y. et al. Histological assessment of the mouse uterus from birth to puberty for the appearance of LGL-1+ Natural Killer cells. **Biol. Reprod**, v. 47, p. 227-232, 1992.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol Rev**, v. 71, p. 93-127, 1991.

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

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

KOPYDLOWSKI, K. M. et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. **J. Immunol**, v. 163, p. 1537–1544, 1999.

KRUSE, A. et al. Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. **Biol Reprod**, v. 66, p. 333–345, 2002.

KULANDAVELU, S.; QU, D.; ADAMSON, S. L. Cardiovascular function in mice during normal pregnancy and in the absence of endothelial NO synthase. **Hypertension**, v.47, n. 6, p.1175-1182, 2006.

KURSCHUS, F. C. et al. Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfatedependent endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 13799–13804, 2008.

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

KUTTY, R. K.; MAINES, M. D. Selective induction of heme oxygenase-1 isoenzyme in rat testis by human chorionic gonadotrophin. **Arch Biochem Biophys**, v. 268, p. 100–107, 1989.

KVEHAUGEN, A. S. et al. Endothelial function and circulating biomarkers are disturbed in women and children after preeclampsia. **Hypertension**, v. 58, p. 63-69, 2011.

LANGER, N. O.; BEACH, D.; LINDENBAUM, E. S. Novel hyperactive mitogen to endothelial cells: human decidual NKG5. **Am. J. Reprod. Immunol**, v. 42, p. 263-272, 1999.

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

LASH, G. E. et al. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J Leukoc Biol**, v. 80, p. 572-580, 2006.

LASH, G. E.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta**, v. 31, p. S87–S92, 2010.

LEONARD, B. E. The immune system, depression and the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 25, p. 767-780, 2001.

LEONARD, S. et al. Gestational modification of murine spiral arteries does not reduce their drug-induced vasoconstrictive responses in vivo. **Biol Reprod**, v.89, n. 6, p.139, 2013.

LEVINE, R. J. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, v. 350, p. 672-683, 2004.

LI, L. et al. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. **Free Radic Biol Med**, v. 47, p. 103–113, 2009.

LI, X. F. et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine Natural Killer cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 86, p. 1823-1834, 2001.

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

LIMA, P. D. A. et al. Leukocyte driven-decidual angiogenesis in early pregnancy. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 11, p. 522-537, 2014.

LINNEMEYER, P. A.; HAMILTON, M. S. A monoclonal antibody, 4h12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine deciduas. **J. Reprod. Immunol**, v. 17, p. 279-294, 1990.

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

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

LUTTUN, A.; TJWA, M.; CARMELIET, P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. **Ann N Y Acad Sci**, v. 979, p. 80-93, 2002.

MACDONALD-WALLIS, C. et al. Blood pressure change in normotensive, gestational hypertensive, preeclamptic, and essential hypertensive pregnancies. **Hypertension**, v. 59, p. 1241-1248, 2012.

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

MAKRYDIMAS, G. et al. Physiological distribution of placental growth factor and soluble Flt-1 in early pregnancy. **Prenat Diagn**, v. 28, p. 175-179, 2008

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

MANCINI, J. A. et al. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. **J. Biol. Chem**, v. 276, p. 4469-4475, 2001.

MANOURY, B.; MONTIEL, V.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. **Cardiovasc Res**, v. 94, p. 304-315, 2012.

MARCELLINI, M. et al. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. **The American journal of pathology**, v. 169, p. 643-654, 2006.

MARTYN, C. N. et al. Growth in utero and cognitive function in adult life: follow up study of people born between 1920 and 1943. **BMJ**, v. 312, p. 1393-1396, 1996.

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

MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Front BiosciSep**, v. 9, p. 2819-2826, 2004.

MATTE, T. D. et al. Influence of variation in birth weight within normal range and within sibships on IQ at age 7 years: cohort study. **BMJ**, v. 323, p. 310-314, 2001.

MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, v. 111, p. 649-658, 2003.

METKAR, S. S. et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. **Immunity**, v. 16, p. 417-428, 2002.

MCCARTHY, A. L. et al. Functional characteristics of small placental arteries. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, p. 945-951, 1994.

MCDONALD, S. D. et al. Measures of cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis in a cohort of women with a remote history of preeclampsia. **Atherosclerosis**, v. 229, p. 234-239, 2013.

MCFAUL, S. J.; MCGRATH, J. J. Studies on the mechanism of carbon monoxide-induced vasodilatation in the isolated perfused rat heart. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 87, p. 464-473, 1987.

MCQUEEN, K. L. et al. Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c. **Immunogenetics**, v. 48, p. 174-183, 1998.

MILLAUER, B. et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. **Nature**, v. 367, n. 6463, p. 576-579, 1994.

MILLS, J. L. et al. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study, **JAMA**, v. 282, p. 356-362, 1992.

MINGARI, M. C. et al. Interleukin-15-induced maturation of human Natural Killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. **Eur J Immunol**, v. 27, p. 1374–1380, 1997.

MORITA, T. et al., Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 1475–1479, 1995.

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

MURAKAMI, M. et al., Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2, **J. Biol. Chem**, v. 275, p. 32783–32792, 2000.

MUTTUKRISHNA, S. et al. Soluble Flt-1 and PlGF: new markers of early pregnancy loss? **PLoS One**, v. 6, p. e18041, 2011.

MYATT, L. et al. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 166, p. 224–230, 1992.

MYATT, L. et al. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. **Hum Reprod**, v. 12, p. 167–172, 1997.

MYOKEN, Y. et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 13, p. 5819-5823, 1991.

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

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

OCHSENBEIN-KOLBLE, N. et al. Cross sectional study of automated blood pressure measurements throughout pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.111, n. 4, p. 319-325, 2004.

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

OWYANG, C.; HASLER, W. L. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. VI. Pathogenesis and therapeutic approaches to human gastric dysrhythmias. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 283, p. G8-15, 2002.

PAFFARO JR, V. A. et al. Subset Classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells by DBA Lectin Reactivity. **Placenta**, v. 24, p. 479-488, 2003.

PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressivelike behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**, Alfenas, v. 215, p.146–151, 2010

PARK, J. et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, p. 25646-25654, 1994.

PARR, E. L. et al. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are Natural Killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **J. Immunol**, v. 145, p. 2365-2372, 1990.

PATEL, P. et al. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. **Reprod Biol Endocrinol**. v. 7, p. 10, 2009.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**, v. 115, p. 1-7, 1989.

PHILLIPS, H. S. et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. **Endocrinology**, v. 127, p. 965-967, 1990.

PIJNENBORG, R. et al. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. **Placenta**, v. 4, p. 397–413, 1983.

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

POLLARD, J. W. et al. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSD-1 in female fertility. **Dev. Biol**, v. 148, p. 273-283, 1991.

POWERS, R. W. et al. Soluble fms-Like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PlGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. **PLoS One**, v. 5, p. e13263, 2010.

POWERS, R. et al. Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia. **Hypertension**, v. 60, p. 239-246, 2012.

PRINS, J. R.; GOMEZ-LOPEZ, N.; ROBERTSON, S. A. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. **J Reprod Immunol**, v. 95, p. 1-14, 2012.

PUZANOV, I. J.; BENNETT, M.; KUMAR, V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of Natural Killer cells. **J Immunol**, v. 157, p. 4282–4285, 1996.

PYHALA, R. et al. Neurocognitive abilities in young adults with very low birth weight. **Neurology**, v. 77, p. 2052-2060, 2011.

RAFII, S. et al. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 996, p. 49-60, 2003.

RAIKKONEN, K. et al. Growth trajectories and intellectual abilities in young adulthood: the Helsinki Birth Cohort Study. **Am J Epidemiol**, v. 70, p. 447-55, 2009.

RAMSEY, E. M.; DONNER, M. W. **Placental Vasculature and Circulation**, Georg Thieme, Stuttgart. 1980.

RÄTSEP, M. T. et al. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. **Reproduction**, v. 149, n. 2, p. R91-102, 2015.

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

RAY, J. G. et al. Heart failure and dysrhythmias after maternal placental syndromes: HAD MPS Study. **Heart**, v. 98, p. 1136-1141, 2012.

REDLINE, R. W.; LU, C. Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. **Lab. Invest**, v. 61, p. 27-36, 1989.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C. A. B. **Obstetrícia fundamental**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 73-87, 2003.

RIBATTI D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. **Angiogenesis**, v. 11, n. 3, p. 215-221, 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RICHARDS, M. et al. Birthweight, postnatal growth and cognitive function in a national UK birth cohort. **Int J Epidemiol**; v. 31, p. 342-348, 2002.

RITZ, J. et al. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. **Adv Immunol**, v. 42, p. 181-211, 1988.

ROMANOVSKY, A. A. Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved? **Front Biosci**, v. 9, p. 494-504, 2004.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci.**, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

ROMANOVSKY, A. A.; STEINER, A. A.; MATSUMURA, K. Cells that trigger fever. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2195-2197, 2006.

ROMERO, R. et al. Two-thirds of spontaneous abortion/fetal deaths after genetic midtrimester amniocentesis are the result of a pre-existing subclinical inflammatory process of the amniotic cavity. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v. 172, p. 261-267, 1995.

ROMERO, M. et al. Sex differences in the beneficial cardiac effects of chronic treatment with atrial natriuretic Peptide in spontaneously hypertensive rats. **PLoS One**, v. 8, p. e71992, 2013.

ROY, H. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A. **Human gene therapy** v. 16, p. 1422-1428, 2005.

SALLES, E.S.L. **Responsividade das células Natural Killer Uterinas DBA+ às alterações nutricionais durante a prenhez de camundongos**. 2014. 132f. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à saúde). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas. 2014.

SANDBO, N. et al. NO: Down regulation of smooth muscle α -actina expression by bacterial lipopolysaccharide. **Cariovascular Res** v.74, p.262-269, 2007.

SATTAR, N.; GREER, I. A. Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening. **BMJ**, v. 325, p 157-160, 2002.

SCHILDKNECHT, S. et al. COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. **FASEB J**, v. 18, p. 757-759, 2004.

SCHMITZ, T. et al. PDE4 Inhibition Prevents Preterm Delivery Induced by an Intrauterine Inflammation. **J. Immunol**, v. 178, p. 1115–1121, 2007.

SELVARAJ, S. et al. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. **Blood**, v. 102, p. 1515-1524, 2003.

SHENKIN, S. D. et al. Birth weight and cognitive function at age 11 years: the Scottish Mental Survey 1932. **Arch Dis Child**; v. 85, p.189-96, 2001.

SHIBAHARA, S.; MÜLLER, R. M.; TAGUCHI, H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. **J Biol Chem**, v. 262, p. 2889 – 2892, 1987.

SHEFFIELD, J. S. Sepsis and septic shock in pregnancy. **Crit Care Clin**, v. 20, p. 651-660, 2004.

SHEIKHI, A. K. et al. Are Natural Killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? **Pak J Biol Sci**, v. 10, p. 2885-2889, 2007.

SILVA, E. et al. Sepsis: from bench to bedside. **Clinics**, v. 63, p. 110-120, 2008.

SILVER, E. T. et al. Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H 2D(k) and H-2D(d). **J Immunol**, v. 166, p. 2333-2341, 2001.

SLATTERY, M. M.; MORRISON, E. J. J. Preterm delivery. **Lancet**, v. 360, p. 1489–1497, 2002.

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

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology, **Annu. Rev. Biochem**, v. 69, p. 149–182, 2000.

SMITH, W. L., MURPHY, R.C. The eicosanoid: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways, in: VANCE, D.E., VANCE, J.E. (Eds.), **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**, 4th ed., Elsevier Science B.V. p. 341–371, 2002.

SMITH, S. E. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **J Neurosci**, v. 27, p. 10695-10702, 2007.

SMITH, G. N. et al. A history of preeclampsia identifies women who have underlying cardiovascular risk factors. **Am J Obstet Gynecol** v.58, p e1-8. 2009.

SMYTH, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 501-510, 2005.

SOMMERFELT, K; MARKESTAD, T; ELLERTSEN, B. Neuropsychological performance in low birth weight preschoolers: a population-based, controlled study. **Eur J Pediatr**, v. 157, p. 53-58, 1998.

SORENSEN, H. T. et al. Birth weight and cognitive function in young adult life: historical cohort study. **BMJ**; v. 315, p. 401-403, 1997.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. Fever and anapyrexia in systemic inflammation: intracellular signaling by cyclic nucleotides. **Front Biosci**, v. 8, p. S1398-1408, 2003.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370, 1985.

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

STEWART, I.J.; MITCHELL, B. S. The distribution of uterine macrophages in virgin and early pregnant mice. **J Anat**, v. 179, p. 183-96, 1991.

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

STICHTENOTH, D. O. et al. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells, **J. Immunol**, v. 167, p. 469-474, 2001.

STRANG-KARLSSON, S. et al. Slower reaction times and impaired learning in young adults with birth weight 1500 g. **Pediatrics**, v. 125, p. e74-82, 2010

SUN, J. C.; BEILKE, J. N.; LANIER, L. L. Adaptive immune features of Natural Killer cells. **Nature**, v. 457, p. 557-561, 2009.

TAYADE, C. et al. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine Natural Killer cells. **J Leukoc Biol**, v. 78, p. 1347-1355, 2005.

TAYADE, C. et al. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. **J Immunol**, v. 178, p. 4267-4275, 2007.

TAYLOR, R. N. et al. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 188, n. 177-182, 2003.

TEELING, J. L. et al. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain Behav Immun**, v. 2, n.3, p. 409-419, 2010.

TENHOLA, S. et al. Maternal preeclampsia predicts elevated blood pressure in 12-year-old children: evaluation by ambulatory blood pressure monitoring. **Pediatr Res**, v. 59, p. 320-324, 2006.

THADHANI, R. et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. **Circulation**, v. 124, p. 940-950, 2011.

THOREN, S.; JAKOBSSON, P. J; Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4, **Eur. J. Biochem**, v. 267, p. 6428–6434, 2000.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J Clin Invest**, v. 108, p. 15–23, 2001.

TJWA, M. et al. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 5-14, 2003.

TORRY, D. S. et al. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. **Am J Obstet Gynecol**, v. 179, p. 1539-1544, 1998.

TRAKSHEL, G. M.; MAINES, M. D. Multiplicity of heme oxygenase isoenzymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. **J Biol Chem**. v. 264, p. 1323–1328, 1989.

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

TOPORSIAN, M. et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Circ Res**, v. 96, n. 6:684e92, 2005.

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

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

TSIARAS, S.; POPPAS, A. Cardiac disease in pregnancy: value of echocardiography. **Curr Cardiol Rep**, v. 12, p. 250-256, 2010.

TUOVINEN, S. et al. Maternal hypertensive disorders in pregnancy and self-reported cognitive impairment of the offspring 70 years later: the Helsinki Birth Cohort Study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 208, p. 200 e201-209, 2013.

VACCA, P. et al. Analysis of Natural Killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK cell function. **Blood**, v. 108, p. 4078–4085, 2006.

VAN DEN HEUVEL, M. J. et al. A review of trafficking and activation of uterine Natural Killer cells. **Am J Reprod Immunol**, v. 54, p.322-331, 2005.

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

VERLOHREN, S.; STEPAN, H.; DECHEND, R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, p. 43-52, 2012.

VERMA, S.; KING, A.; LOKE, Y. W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine Natural Killer cells. **Eur. J. Immunol**, v. 27, p. 979-983, 1997.

VITVITSKY, V. et al. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. **J Biol Chem**, v. 281, p. 35785–35793, 2006.

VON RANGO, U. et al. Apoptosis of extravillous trophoblast cells limits the trophoblast invasion in uterine but not in tubal pregnancy during first trimester. **Placenta**, v. 24, p. 929–940, 2003.

VRACHNIS, N. et al. Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 26, p. 995-1002, 2013.

WALSH, S. W. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. **Am J. Obstet. Gynecol**, v. 152, p. 335-340, 1985.

WELCH, P. C. et al. Correlations of placental perfusion and PlGF protein expression in early human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, p. 1625-1629, 2006.

WHITEMAN, M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability. **J Cell Mol Med**. v. 13, p.488–507, 2009.

YANG, G. et al. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. **Science**. v. 322, p. 587–590, 2008.

YANG, K.; BANERJEE, S.; PROWELLER, A. Regulation of pre-natal circle of Willis assembly by vascular smooth muscle Notch signaling. **Dev Biol**, v. 381, p. 107-120, 2013.

YONEKURA, H. et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 35172-35178, 1999.

YOON, B. H.; PARK, C. W.; CHAIWORAPONGSA, T. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. **BJOG**, v. 110, p. 124–127, 2003.

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

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

ZAVAN, B. et al. Adhesion Molecules in mouse pregnant uterus. **The Anatomical Record**, Alfenas, v. 293, p. 1081-1088, 2010.

ZAVAN, B. **Aspectos morfofisiológicos e comportamentais após inflamação induzida por LPS durante a gestação de camundongos**. 2011, 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 1994.

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

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

ZHANG, J.; ADAMS, M. A.; CROY, B. A. Alterations in maternal and fetal heart functions accompany failed spiral arterial remodeling in pregnant mice. **Am J Obstet Gynecol**, v. 205, p. 485 e481-416, 2011.

ZHAO W. et al. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. **Embo J**, v. 20, p. 6008–6016, 2001.

ZHAO, W. et al. Levels of antiangiogenic factors in preeclamptic pregnancies. **Growth Factors**, v. 28, p. 293-298, 2010.

ZICHE, M. et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 76, p. 517-531, 1997.

ANEXO I

α -ACTIN DOWN REGULATION AND PERFORIN LOSS IN UTERINE NATURAL KILLER CELLS FROM LPS-TREATED PREGNANT MICE

Bruno Zavan, Andréa Mollica Amarante-Paffaro, Valdemar Antonio Paffaro Junior.*

Integrative Animal Biology Laboratory, Biomedical Science Institute, Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:

Paffaro Jr VA. Biomedical Science Institute. UNIFAL-MG. 700 Gabriel Monteiro da Silva Street, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Post Code: 37130-000.

Tel: 55-35-3299-1300

Email: paffaroj@gmail.com (V.A. Paffaro Jr.)

Summary

One of the most abundant immunologic cell types in early decidua is the uterine Natural Killer (uNK) cell that despite the presence of cytoplasmic granules rich in perforin and granzymes does not degranulate in normal pregnancy. UNK cells are important producers of angiogenic factors that permit normal dilation of uterine arteries to provide increased blood flow for the growing feto-placental unit. Gram-negative bacteria Lipopolysaccharide (LPS) administration can trigger an imbalance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines impairing the normal immune cells activity as well as uterine homeostasis. The present study aimed to evaluate by immunohistochemistry the reactivity of perforin and α -actin on uNK cell from LPS-treated pregnant mice. For the first time, we demonstrate that LPS injection in pregnant mice causes α -actin down regulation, concomitantly with perforin loss in uNK cells. This suggests that LPS alters uNK cell migration and activates cytotoxic granule release.

Keywords: α -actin, Perforin, uNK, Lipopolysaccharide, Pregnancy, Mouse

uNK cells are present in the uterus during pregnancy in animals with hemochorial placentation, such as humans and rodents (Tayade et al. 2007). In mice, the precursor of these cells migrates from the bone marrow (Peel et al. 1983; Lysiak and Lala 1992) and from secondary lymphoid organs such as the spleen (Moore et al. 1996; Chantakru et al. 2002; Zavan et al. 2012) arriving in the uterus during early pregnancy (Kruse et al. 2002) displaying an immature cell morphology with few cytoplasmic granules (Paffaro Jr. et al. 2003). These cells develop and proliferate in this environment (Stewart and Peel 1981), reaching the maximum number of cells around gestational day (gd) 10. According to Paffaro Jr et al. (2003) during this period of pregnancy most of these cells show mature cell morphology, filled with cytoplasmic granules that could be identified by Periodic-acid Schiff (PAS) histochemistry due to the amylase resistant glycoprotein content in their granules (Peel 1989; Paffaro-Jr et al. 2003; Zhang et al. 2009). Some of these PAS+ uNK cells are negative to Dolichos biflorus agglutinin lectin (DBA-) (Zhang et al. 2009). However, DBA lectin can selectively label (Paffaro-Jr et al. 2003) the angiogenic subtype of these cells in the pregnant mouse uterus (Chen et al. 2012). DBA+ uNK cells become the dominant subset in mid-pregnancy (Chen et al., 2012) reaching their peak in number (Ashkar and Croy 1999) in a gestational period where the opening of utero-placental circulation occurs (Aasa et al. 2013). After this period, uNK cells begin a senescent process and decrease in quantity until the end of pregnancy (Delgado et al. 1996; Rajagopalan and Long 2012).

Inflammation can be induced in experimental animals by exposure to gram-negative bacteria cell walls, specifically lipopolysaccharide (LPS), mimicking the acute phase of the inflammatory response, without causing infection in the host (Burrell, 1994). Sepsis during pregnancy is recognized as the primary cause of preterm birth (Goldenberg *et al.* 2000) and the major cause of human neonatal morbidity and mortality (Slattery *et al.* 2002). There is considerable interest in the development of novel therapeutic strategies that could contribute to a reduction of preterm birth (Pizarro and Troster 2007).

In normal pregnancy, despite the presence of cytoplasmic granules rich in perforin and granzymes (Kopcow *et al.* 2005; Smyth, 2005), uNK cells do not degranulate, having as their main function the production of vasoactive agents such as Interferon gamma (IFN- γ), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Nitric

Oxide (NO) that promote vascular remodeling, an essential process to ensure healthy pregnancy development (Ashkar and Croy 1999; Hanna *et al.* 2006). There are no evidences in literature on LPS changing uNK migration or causing lytic granule release.

In many secretory cell types, the fusion of lytic granules with the plasma membrane requires the disassembly of cortical actin, since this structure can function as a barrier to exocytosis (Trifaro *et al.* 1992; Sugawara *et al.* 1993; Roth and Burgoyne 1995; Chowdhury *et al.* 2000; Gil *et al.* 2000; Yoneda *et al.* 2000; Lyubchenko *et al.* 2003). Moreover, in circulating NK cells actin polymerization for filamentous actin (F-actin) formation (Carpen *et al.* 1983) is required for cytotoxic function (Katz *et al.* 1982).

Actin cytoskeletal rearrangements probably precede perforin mobilization (Orange *et al.* 2002), however, little is known about contractile actin expression (α -actin) and cell migration during the cytotoxic activation process in uNK cells during pregnancy.

For evaluation of the LPS effects during mouse pregnancy with focus on the uNK, forty virgin female Swiss Webster mice (8-12 weeks age) were mated with congenic males and the morning of vaginal plug detection was called dg1. Mice were maintained in the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas (Unifal-MG, Brazil) and housed under controlled light and temperature conditions with access to food and water *ad libitum* as approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UNIFAL-MG.

Mice at mid pregnancy (dg10) received an intraperitoneal (ip) injection of LPS serotype 026:B6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in sterile isotonic saline (100 μ g/Kg). Implantation sites were collected 30 minutes, 1 hour and 2 hours after treatment (n=10 each group). The control group (n=10) received only saline (0.9% NaCl).

Mice were anesthetized with Ketamine hydrochloride solution and Xylazine hydrochloride (#K-002 and #X1251. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) before perfusion fixation with 4% paraformaldehyde (#P6148. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS (50mM). The sites of developing embryos were dissected from the uterus and processed for paraffin embedding. Tissue was cut at 7 μ m thickness,

mounted on poly-L-lysine coated slides for *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) lectin histochemistry and immunohistochemistry for α -actin and perforin.

Histological sections were deparaffinized, hydrated and treated with 1% hydrogen peroxide (#216763. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 minutes. After washing with 50mM PBS, sections were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) (#05470. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS for 30 minutes, and 3 μ g/ml biotinylated DBA lectin (#L9142. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or 5 μ g/ml polyclonal rabbit anti-mouse α -actin (#A2103. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 1% PBS/BSA overnight at 4°C. When using the α -actin antibody the sections were incubated with 2 μ g/ml goat biotinylated anti-rabbit (#B8895. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After washing with PBS, sections were incubated with streptavidin-peroxidase (Chemicon International, Temecula, CA, USA); 1h, room temperature and visualized with 3,3-diaminobenzidine (#D12384. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 50 mM TBS containing 0.1% hydrogen peroxide. Sections were counterstained with Harris's hematoxylin, mounted with Entellan (Merck kGAa 64271 #HX378130 Darmstadt, Germany) and observed by light microscopy (Nikon Eclipse 80i, Tokyo, Japan).

The double staining for DBA Lectin and anti-perforin was developed in deparaffinized sections, and after washing with PBS, incubated with 1% PBS/BSA for 30 minutes and 1h incubation with FITC conjugated DBA lectin 18 μ g/ml (#L9142. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After washing with PBS, the sections were incubated overnight at 4°C with 5 μ g/ml polyclonal rabbit anti-mouse perforin (#PA1-22489. Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Sections were incubated with 2 μ g/ml sheep anti-rabbit conjugated with Cy3 (#C2306. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1h. All negative controls were developed by omitting the DBA lectin and/or the primary antibody during the procedure. Sections were mounted with anti-fading medium (#H-1000 Vectashield, Vector Co. Burlingame, CA, USA) and observed with fluorescence ($\lambda=494$ and $\lambda=488$ for FITC/ $\lambda=520$ and $\lambda=560$ for Cy3) microscopy (Nikon Eclipse 80i/Japan).

At the time of sample collection there was no macroscopic evidence of conceptus death at 30 minutes, 1h and 2h after LPS. However, the results described below refer to all implantation sites analyzed by histochemical and immunohistochemical technique. The DBA lectin reactivity on the membrane surface and granules, widely described in the literature, allowed us to identify the

uterine natural killer cells (Figura 1A) and no positive reaction was found in the developed negative control (Figura 1B).

Felker and colleagues (2013) have recently described for the first time that DBA⁻ uNK cells in normal mice are smaller throughout pregnancy than DBA⁺ cells. In addition, Zhang and colleagues (2009) showed that the DBA⁻ uNK cells account for just 10% of total uNK cells in mid pregnant mouse uterus. In this context, even without uNK cells double staining for α -actin and DBA lectin in this study, the large size, incidence, morphology and location of the α -actin positive cells observed in control mice strongly suggests that these cells are DBA⁺ uNK cells (Figura 1C). Thirty minutes after LPS injection, these cells showed a decrease of α -actin labeling (Figura 1D), followed by the total loss of α -actin reactivity after 1h (Figura 1E) and 2h (Figura 1F) treatment.

It was possible to observe strong DBA lectin (Figura 1H) and perforin (Figura 1K) staining on the granules of the same uNK cells from control mice, while 1 hour after LPS injection there was only weak DBA lectin staining of these granules (Figura 1I) that was concomitant with the loss of perforin labeling (Figura 1L) in the same cell. No reaction was observed in either negative controls, DBA lectin (Figura 1G) or perforin staining (Figura 1J).

Interestingly the positive reaction for α -actin that was found in uNK cells was polarized toward the direction of the implanted embryo. These results suggest the α -actin polarization on uNK cells may be to assemble the focal contacts likely to migrate toward the region near the implanted embryo. This corroborates studies that suggested mice uNK cells migrate from the myometrium to areas close to the embryo during mouse pregnancy on a fibronectin rich substrate (Paffaro Jr *et al.* 2003; Zavan *et al.* 2010), where they became differentiated and play important roles in vessel dilation and embryo nutrition (Ratsep *et al.* 2014) by preparing for the opening of mouse utero-placental circulation by gd10 (Aasa *et al.* 2013). In addition, the decrease of α -actin labeling at 1h post-LPS and total loss of α -actin labeling 2h after treatment occurred over the same period that perforin expression became undetectable.

Therefore, we hypothesize that LPS ip injection has indirectly activated uNK cells, supported by the literature which shows that many immune cell types recognize LPS through toll-like receptor 4 (TLR4) assisted by LPS binding protein

(LBP) (Fernández-Pérez *et al.* 2005; Sabroe *et al.* 2005; Guinn *et al.* 2007; Gerondakis *et al.* 2001) causing a intracellular signaling cascade resulting in NF- κ B activation (Hirsch and Wang 2005), which leads to transcription of pro-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interleukin-1 and interleukin-6 (Buhimschi *et al.* 2003; Schmitz *et al.* 2007). The increase in pro-inflammatory cytokines at the uterus, especially TNF- α after 2h of LPS administration (Faas *et al.* 2004; Cotechini *et al.* 2014), can be harmful for the pregnancy by activating uNK cells (Murphy *et al.* 2005; 2009; Erlebacher *et al.* 2013) to release their granules while having their migration impaired.

Therefore, this short and prospective study suggests that LPS ip injection during mid-gestation in mice may indirectly and very early promote disorganization of α -actin filaments and disassembly of focal contacts of uNK cells impairing their migration while activating their cytotoxicity

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to Andrew Edwards, Kingston, Canada for language review of the manuscript and for valuable suggestions, and also to the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for support of this work.

References

- AASA KL, KWONG KK, ADAMS MA, CROY BA: Analysis of maternal and fetalcardiovascular systems during hyperglycemic pregnancy in the nonobese diabeticmouse. *Biol Reprod* **88**: 151, 2013.
- ASHKAR AA, CROY BA: Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* **61**: 493-502, 1999.
- BUHIMSCHI IA, BUHIMSCHI CS, WEINER CP: Protective effect of N-acetylcysteine against fetal death and preterm labor induced by maternal inflammation. *Am J Obstet Gynecol* **188**: 203–208, 2003.
- BURRELL R: Human responses to bacterial endotoxin. *Circ Shock* **3**:137-53, 1994.
- CARPÉN O, VIRTANEN I, LEHTO VP, SAKSELA E: Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J Immunol* **131**: 2695-2698, 1983.
- CHANTAKRU S, MILLER C, ROACH LE, KUZIEL WA, MAEDA N, WANG WC, *et al.*: Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. *J Immunol* **168**: 22-28, 2002.
- CHEN Z, ZHANG J, HATTA K, LIMA PD, YADI H, COLUCCI F, YAMADA AT, CROY BA: DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. *Biol Reprod* **87**: 81, 2012.
- CHOWDHURY HH, POPOFF MR, ZOREC R: Actin cytoskeleton and exocytosis in rat melanotrophs. *Pflugers Arch* **439**: R148–149, 2000.
- COTECHINI T, KOMISARENKO M, SPEROU A, MACDONALD-GOODFELLOW S, ADAMS MA, GRAHAM CH: Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia. *J Exp Med* **211**(1): 165-79, 2014.
- DELGADO SR, MCBEY BA, YAMASHIRO S, FUJITA J, KISO Y, CROY BA: Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a Natural Killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J Leukoc Biol* **59**: 162-169, 1996.

- ERLEBACHER A: Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol* **31**: 387-411, 2013.
- FAAS MM, BROEKEMA M, MOES H, VAN DER SCHAAF G, HEINEMAN MJ, DEVOS P: Altered monocyte function in experimental preeclampsia in the rat. *Am J Obstet Gynecol* **191**(4): 1192-8, 2004.
- FELKER AM, CHEN Z, FOSTER WG, CROY BA: Receptors for non-MHC ligands contribute to uterine natural killer cell activation during pregnancy in mice. *Placenta* **34**: 757-764, 2013.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ ER, SALMAN S, PENDEM S, FARMER JC: Sepsis during pregnancy. *Crit Care Med* **33**: S286-93, 2005.
- GERONDAKIS S, GRUMONT RJ, BANERJEE A: Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol Cell Biol* **85**(6): 471-475, 2007.
- GIL A, RUEDA J, VINIEGRA S, GUTIERREZ LM: The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **98**: 605–614, 2000.
- GOLDENBERG RL, HAUTH JC, ANDREWS WW: Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* **342**(20): 1500-1507, 2000.
- GUINN DA, ABEL DE, TOMLINSON MW: Early goal directed therapy for sepsis during pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* **34**: 459-479, 2007.
- HANNA J, GOLDMAN-WOHL D, HAMANI Y, AVRAHAM I, GREENFIELD C, NATANSON-YARON S: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. *Nat Med* **12**: 1065-74, 2006.
- HIRSCH, E, WANG H: The molecular pathophysiology of bacterially induced preterm labor: insights from the murine model. *J Soc Gynecol Investig* **12**: 45–155, 2005.
- KATZ P, ZAYTOUN AM, LEE JH JR: Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. III. Dependence of natural killing on microtubule and microfilament integrity. *J Immunol* **129**(6): 2816-25, 1982.
- KOPCOW HD, ALLAN DS, CHEN X, RYBALOV B, ANDZELM MM, GE B, *et al.*: Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci USA*; **102**: 15563-8, 2005.
- KRUSE A, MARTENS N, FERNEKORN U, HALLMANN R, BUTCHER EC:

- Alterations in the expression of homing-associated molecules at the maternal/fetal interface during the course of pregnancy. *Biol Reprod* **66**: 333-45, 2002.
- LYSIAK JJ, LALA PK: In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the deciduas of normal murine pregnancy. *Biol Reprod* **47**: 603-13, 1992.
- LYUBCHENKO TA, WURTH GA, ZWEIFACH A: The actin cytoskeleton and cytotoxic T lymphocytes: evidence for multiple roles that could affect granule exocytosis-dependent target cell killing. *J Physiol* **547**: 835-47, 2003.
- MOORE TA, BENNETT M, KUMAR V. Natural Killer cell differentiation: past, present, future. *Immunol Res* **15**: 151-62, 1996.
- MURPHY SP, FAST LD, HANNA NN, SHARMA S: Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *J Immunol* **175**: 4084-90, 2005.
- MURPHY SP, HANNA NN, FAST LD, SHAW SK, BERG G, *et al.*: Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. *Am J Obstet Gynecol* **200**: 308.e1-9, 2009.
- ORANGE JS, RAMESH N, REMOLD-O'DONNELL E, SASAHARA Y, KOOPMAN L, BYRNE M, BONILLA FA, ROSEN FS, GEHA RS, STROMINGER JL: Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(17): 11351-6, 2002.
- PAFFARO VA JR, BIZINOTTO MC, JOAZEIRO PP, YAMADA AT: Subset classification of mouse uterine Natural Killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* **24**: 479-88, 2003.
- PEEL S, STEWART IJ, BULMER D: Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. *Cell Tissue Res* **233**(3): 647-56, 1983.
- PEEL S: Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **115**:1-112, 1989.
- PIZARRO CF, TROSTER E J: Função adrenal na sepse e choque séptico. *Jornal de Pediatria* **3**: 155-62, 2007.

- RAJAGOPALAN S, LONG EO: Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 20596-601, 2012.
- RÄTSEP MT, FELKER AM, KAY VR, TOLUSSO L, HOFMANN AP, CROY BA: Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction* In press, 2014.
- ROTH D, BURGOYNE RD: Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganization of the cortical actin network. *FEBS Lett* **374**: 77-81, 1995.
- SABROE I, DOWER SK, WHYTE MK: The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* **7**:S421-6, 2005.
- SCHMITZ T, SOUIL E, HERVÉ R, NICCO C, BATTEUX F, GERMAIN G, CABROL D, EVAÏN-BRION D, LEROY MJ, MÉHATS C: PDE4 inhibition prevents preterm delivery induced by an intrauterine inflammation. *J Immunol* **178**(2): 1115-21, 2007.
- SLATTERY, MM, MORRISON EJJ: Preterm delivery. *Lancet* **360**: 1489-1497, 2002.
- SMYTH MJ, CRETNEY E, KELLY JM, WESTWOOD JA, STREET SE, YAGITA H, TAKEDA K, *et al.*: Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* **42**: 501-10, 2005.
- STEWART I, PEEL S: Granulated metrial cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. *J Anat* **133**: 535-41, 1981.
- SUGAWARA S, KASLOW HR, DENNERT G: CTX-B inhibits CTL cytotoxicity and cytoskeletal movements. *Immunopharmacology* **26**, 93-104, 1993.
- TAYADE C, FANG Y, HILCHIE D, CROY BA: Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midGestation fetal loss. *J Leukoc Biol* **82**: 877-86, 2007.
- TRIFARO JM, RODRIGUEZ DEL CASTILLO A & VITALE ML: Dynamic changes in chromaffin cell cytoskeleton as prelude to exocytosis. *Mol Neurobiol* **6**: 339-358, 1992.
- YONEDA M, NISHIZAKI T, TASAKA K, KURACHI H, MIYAKE A, MURATA Y: Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized

GH3 cells: calcium directly regulates F-actin disassembly. *J Endocrinol* **166**: 677–687, 2000.

ZAVAN B, CARVALHO CC, ROSSI JR WC, PAFFARO AMA, PAFFARO JR VA: Splenectomy delays uterine Natural Killer cell recruitment to implantation sites and prolongs pregnancy in mice. *Anat Rec* **295**: 1221-8, 2012.

ZAVAN B, PAFFARO AM, JOAZEIRO PP, YAMADA AT, PAFFARO JR VA: Adhesion molecules in mouse pregnant uterus. *Anat Rec* **293**: 1081-8, 2010.

ZHANG J, YAMADA AT, CROY BA: DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta* **30**: 968e73, 2009.

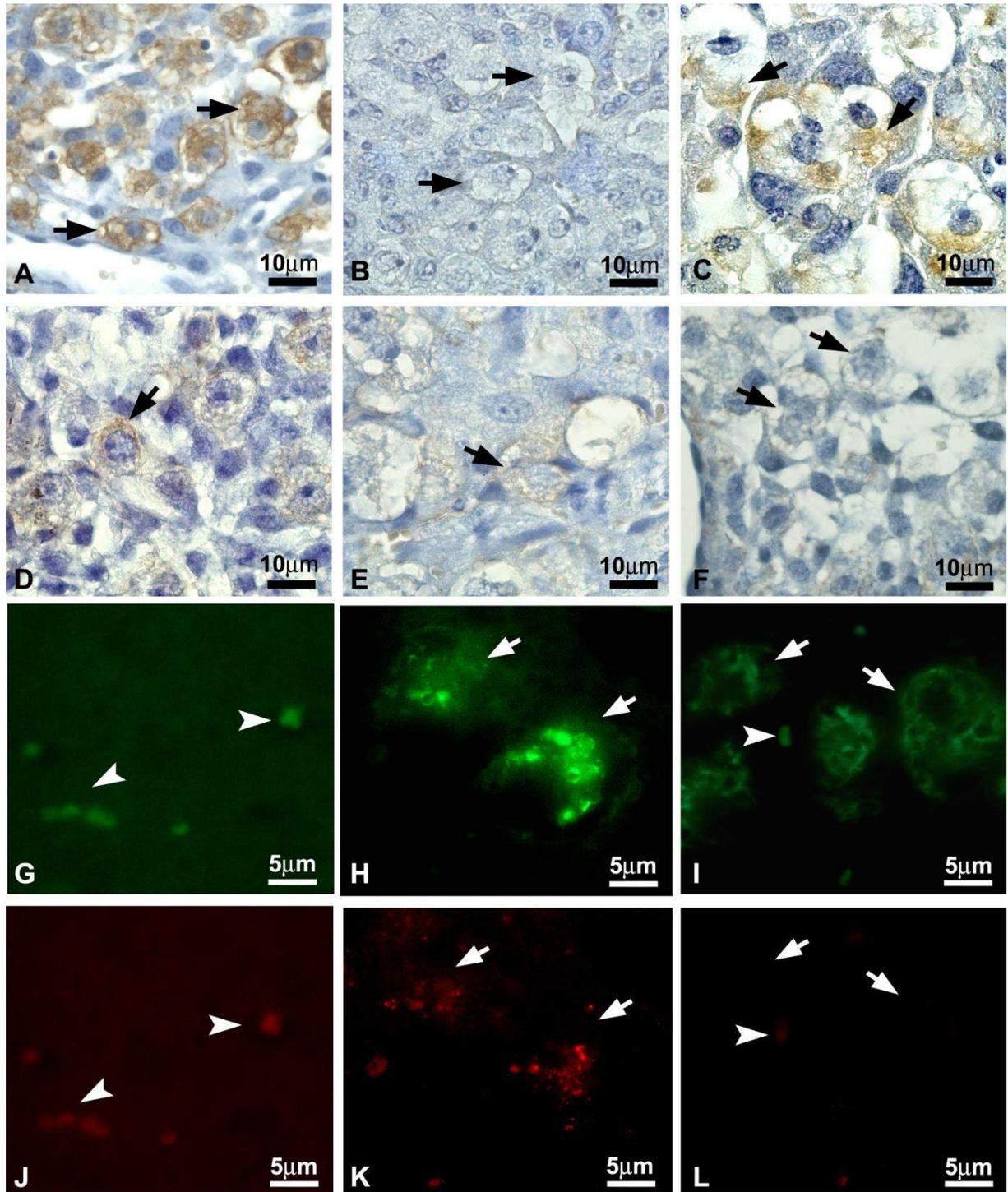


Figure 1. Photomicrographs of implantation sites histological sections from normal pregnant mice at gd10 showing uNK cells (A). Note the DBA lectin reactivity (brown color) on the membrane surface and granules of these cells. DBA Lectin/Peroxidase-DAB/Harris hematoxylin. Negative control for both α -actin and DBA lectin cytochemistry (B). α -actin positive uNK cells can be observed in mice treated with saline (C). After 30 minutes (D), 1 hour (E) and 2 hours (F) of the LPS injection, a reduction in α -actin expression in uNK cells can be observed. α -

actin/Peroxidase-DAB and Harris hematoxylin. Double fluorescent staining of DBA lectin and perforin can be observed (G-L). Note the negative control for DBA lectin (G), the DBA lectin positive reaction at uNK cell granules (H), and uNK DBA staining loss (I) after LPS. Note the negative control for Perforin (J), the positive reaction (perforin) to the granule content (K) and the non-reactivity for perforin (L) in uNK cells from 1h post-LPS. uNK cells (arrows). Red Blood Cells (Arrowheads). DBA FITC-Lectin (green). Perforin-Cy3 (red).

ANEXO II



This document certifies that Mr. Bruno Zavan, a PhD student registered at the Federal University of Alfenas (UNIFAL), in Alfenas MG, Brazil, undertook research training and studies in my laboratory in the Department of Biomedical and Molecular Sciences at Queen's University, Kingston ON Canada.

Mr. Zavan's training interval was from March 1, 2013 until February 27, 2014. Mr. Zavan participated fully in all of the activities typical for a graduate student in my department. He completed all of the compliance training to work with hazardous chemicals, level 2 biosafety materials and with animals in his research. He attended and presented at a weekly journal club, attended and presented at weekly laboratory meetings, attended many seminars presented by international and local faculty and by other graduate students. He prepared research abstracts for submission to meetings and the posters that supported these abstracts for presentation at several meetings he was able to attend.

Mr. Zavan also participated as an auditing (not for credit) student our graduate seminar and laboratory course ANAT839. This course called "Pregnancy" has 26 hours of seminar time and 60 hours of laboratory time. It represents 50% of the course credits needed for a graduate degree program at this University. He was very successful in this course.

Additionally, Mr. Zavan conducted research on pregnancies in mice. The techniques he used ranged from cognitive behavioral with live mice to molecular biology using samples collected from histological sections using laser capture microdissection. Mr. Zavan independently analysed data and prepared figures for manuscripts. He will be writing a paper as first author on the action of Placental Growth Factor on the kidney of mice who are pregnant from his work in Canada. He co-authors two papers that are currently submitted and under review and a number of published and submitted abstracts.

Mr. Zavan has been a dedicated and hard-working student who was a pleasure to host at Queen's University.

A handwritten signature in cursive script that reads "Anne Croy".

Anne Croy, DVM, PhD
Tier 1 Canada Research Chair in Reproduction,
Development and Sexual Function
Department of Biomedical and Molecular
Sciences - Queen's University.
Kingston/ON, Canada

ANEXO III

NIMESULIDE PREVENTS UTERINE ADAPTATION AND DBA+ UNK CELLS CHANGES AFTER SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME INDUCED IN PREGNANT MICE

B Zavan, EM Martins, AM Amarante-Paffaro, VA Paffaro-Jr

Department of Cell, Tissue and Developmental Biology, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil 37130-000

Grants sponsors: FAPEMIG, CAPES, CNPq

One of the most abundant immunologic cell types in early decidua is the uterine Natural Killer (uNK) cell that despite the presence of cytoplasmic granules rich in perforin and granzymes does not degranulate in normal pregnancy. UNK cells are important producers of angiogenic factors that permit normal dilation of uterine arteries to provide increased blood flow for the growing fetoplacental unit. Gram-negative bacteria Lipopolysaccharide (LPS) administration can trigger cyclooxygenase-2 (COX-2) activation leading to an increase in prostaglandin level and an imbalance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines impairing the normal immune cells activity as well as uterine homeostasis. The present study aimed to evaluate if COX-2 inhibitor can alter the effect of LPS on the pregnant uterus, on blood vessels of the decidua, on uNK cells and on litter size; thus contributing to the elucidation of Systemic Inflammatory Syndrome mechanisms during pregnancy. The LPS administration caused excessive immature uNK cells influx in pregnant uterus as well as a decrease in mature uNK cells number concomitantly with altered uNK cells increasing. Such LPS effects could be prevented by the nimesulide pretreatment. The COX-2 inhibition has also prevented perforin releasing by these cells as well as the α -actin down-regulation in uterine blood vessels caused by LPS. The number of pups born from mothers treated with Nimesulide + LPS in mid-pregnancy was smaller than the number of pups born of

mothers who received only LPS on the same gestation day. The injection of nimesulide itself showed no effect in the offspring, leading us to believe that the physiological changes after inflammation induced by LPS are of fundamental importance for the restoration of uterine homeostasis in order to maintain pregnancy to term.

Keywords: Natural Killer. Lipopolysaccharide. Cyclooxygenase. Pregnancy.

1. Introduction

The gestational event is, for the mother, a single moment of morphophysiological adaptation in order to maintain her pattern of vital signs while ensuring adequate fetal development. The regulation of uterine vascular remodeling is part of this larger set of adaptive processes required for successful pregnancy outcome in hemochorial placentation species including humans and rodents [1,2].

In mice, the neoangiogenesis and blood vessels growth occur intensively in early gestation [3] by endothelial proliferation, migration, and differentiation within the preexisting blood vessels as they send out capillary sprouts to initiate the formation of new tube-like structures [4], culminating with the opening of the utero-placental circulation about gestation day (gd) 10 [5,6]. The materno-fetal interface must be perfused without interruption in a velocity suitable for nutrient exchange, and to do so, the uterine spiral arteries must be remodeled creating heavily dilated conduits lacking maternal vasomotor control [7-9].

Animal studies have clearly shown that angiogenesis and vasodilatation of the uterine and placental vessels are imperative for normal fetal growth and survival and is also directly linked to the well-being of the fetus, newborn, and the mother during pregnancy and postpartum [10].

This important angiogenesis process starts at the same time of significant increase in leukocyte numbers in the uterine environment [11,12], wherein the most abundant cell type is the uterine Natural Killer (uNK) cells [13,14].

Periodic-acid Schiff (PAS) histochemistry is widely employed to localize mouse uNK cells in histological sections [15-17] due to amylase resistant glycoprotein content in their granules [21]. However, as first described by Paffaro Jr and colleagues (2003), the majority of uNK cells display surface N-acetylgalactosamine as a terminal sugar, which can be detected by *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) lectin histochemistry enabling the identification of four subtypes of DBA⁺ uNK cells [15].

The subtype I of DBA⁺ uNK cell would be the most immature morphological type of these cells. The DBA lectin reactivity is restricted to the plasma membrane of this subtype because there are no granules in their cytoplasm. Subtype II uNK cell, in turn, would be an intermediate form containing few cytoplasmic granules. The subtype III, a fully differentiated cell containing many granules, prominent nucleoli, nuclei dominated by euchromatin and fully developed endoplasmic reticulum and Golgi complex, were admitted as cells exhibiting a high protein synthesis activity. Subtype IV would correspond to senescent cells [15, 19].

The PAS⁺DBA⁻ uNK cells remains populating the uterus in a constant number throughout the pregnancy. On the other hand, PAS⁺DBA⁺ uNK cells influx to the uterine environment after embryo implantation [integrin], and the beginning of angiogenesis is time matched. [11,12]. These cells proliferate at the exact pregnancy associated neo-vascularization area [20,21] and reaches their peak in a proportion of 70% of total decidual leukocytes [20-22] simultaneously with opening of the utero-placental circulation [5].

DBA+ uNK cells is widely related to promote vascular changes during early pregnancy also for the production of angio-vasculogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) [23,24], placental growth factor (PGF) [25], delta-like ligand 1(DLL1) [26], and they are a putative source of nitric oxide by expression of inducible nitric oxide synthase [26]. These cells also express angiotensin type 1 and 2 receptors, potent blood pressure regulators [27, 18].

Thus, uNK cells play a role in the massive degree of uterine vasculature remodeling that takes place in the early pregnancy, a critical process to ensure proper blood flow through the placenta and, therefore, adequate nutrition of the developing embryo [22].

The balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during pregnancy is essential for immunological tolerance and normal leukocyte functions at the uterine environment [28]. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) can be induced in experimental animals by lipopolysaccharide (LPS) injection. The LPS is the major component of the outer membrane of Gram-negative bacterial cell walls which can be recognized in hosted organism by CD14⁺ cells binding to their Toll-like receptors 4 (TLR4) which triggers an intracellular messenger cascade culminating in NF κ B activation and pro-inflammatory cytokine, chemokines and prostaglandin production [29-31]. This event mimics the acute phase of inflammation without causing infection to the host, but is capable of causing necrosis, preterm birth, IUGR or abortion [32].

The enzyme cyclooxygenase (COX) is responsible for the conversion of arachidonic acid to prostaglandin intermediates [33-35]. The COX-1 isoform is physiologically constitutive and widely expressed in most tissues while COX-2 is

induced acting as a potent inflammatory mediator, since the upregulation of this isoform occurs simultaneously with increase in prostaglandins in a number of biological systems in response to proinflammatory stimuli [36-39]. Prostaglandins can alter blood pressure promoting vasodilation [40] playing important role in cardiovascular disease and pregnancy associated disorders [41,42].

The goal of this study was to study prospectively the effects of a selective inhibitor of prostaglandin COX-2 in the mouse submitted to the Systemic Inflammatory Response Syndrome induced by LPS treatment, focusing in the angiogenic DBA+ uNK cells, Spiral Arteries remodeling and embryo viability concomitantly to the stress-related sickness behavior tracking in these mouse experimental model.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Mice

Female SWISS mice (8-10 weeks age) were syngeneically mated and detection of a copulation plug was considered gestation day1. All mice were maintained in the Central Animal Facility of the Federal University of Alfnas (Unifal-MG) and housed under controlled light (12:12h light-dark cycle) and temperature conditions ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) with access of food and water *ad libidum*. The protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation - Unifal-MG.

2.2. Experimental design and Sample collection

Pregnant mice at gd10 received intraperitoneal injection (i.p.) of saline or LPS (*Escherichia coli*, serotype 026:B6; Sigma-Aldrich Co.) dissolved in sterile isotonic saline (100µg/Kg). At the same gd, pregnant mice received i.p. injection of Nimesulide (5mg/kg) or Nimesude 30min before LPS. The control group received a corresponding volume of tween and saline. After 2h of LPS/saline injection, all animals were submitted to the Elevated Plus-Maze behavioral test or sample collection (n=10 each group).

For sample collection, mice were anesthetized with ketamine and xylazine chloridrate for perfusion fixation with 4% paraformaldehyde in PBS (0.05M) fixative solution. Each animal was perfused for 15 minutes using at least 30mL of fixative solution, and the pregnant uterus was removed. The embryo developing sites were dissected from the uterus and treated for paraffin embedding. Tissue was cut at 7µm thickness, mounted on poly-L-lysine coated slides for *DBA* Lectin histochemical techniques, and immunohistochemical techniques for α -actin and perforin.

2.3. Elevated Plus-Maze test

The elevated plus-maze test is well known test to detect the anxiolytic or anxiogenic-like behavior establishment. The apparatus has two open arms, two closed arms and a central platform forming a suspended cross as described before [43]. Each mouse was placed in the center facing one of the closed arms and video recorded for five minutes. The behavioral parameters evaluated were frequency of entries and the time spent in the open arms and closed. A selective increase in the

parameters corresponding to the open arms (entries and time) reveals an anxiolytic behavior.

2.4. DBA Lectin histochemistry

Histological sections were deparaffinized, hydrated and treated with 1% hydrogen peroxide for 30 min. After washing with 50mM PBS, sections were incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St Louis, USA) in PBS for 30 min, followed by incubation with biotinylated DBA lectin (Sigma, St. Louis, USA) diluted 1:300 in 1%PBS/BSA for 12 hours at 4°C. After washing with PBS, sections were incubated with streptavidin-peroxidase (Chemicon, USA; 1 hour, room temperature) and visualized with 3,3-diaminobenzidine (Sigma, St Louis, USA) in 50mM TBS containing 0.1% hydrogen peroxide. Sections were counterstained with Harris's hematoxylin, mounted with Entellan (Merk, Germany) and observed by light microscopy (Nikon Eclipse 80i/Japan). Negative control sections were submitted to similar incubations that also contained 1% N-acetyl-galactosamine, the specific blocking sugar of DBA lectin.

2.5. Stereological Study

From histological mid-sagittal sections subjected to DBA lectin histochemistry, three sections of three implantation sites of five animals each of the experimental group were used for stereology. This provided density profiles (QA) of the four subtypes of DBA⁺uNK cells in each of three regions of the implantation site (Fig. 1) in test areas (TA) of 10000 μ^2 as described before [15,19]. TA was bounded by a quadratic test system that had two exclusion lines and only the cells in each TA with an observed nucleus were counted.

2.6. Immunohistochemistry for Alpha-actin and Perforin

The α -actin and Perforin immunohistochemistry was performed after histological sections deparaffinization and washing with PBS, incubated with 1% hydrogen peroxide and 1% PBS/BSA for 30 minutes each, and overnight at 4°C with primary antibodies: anti- α -actin 1:100 (Sigma Chemical co. USA) or anti-perforin 1:50 (Sigma Chemical co. USA). After further washing with PBS the histological sections were incubated with secondary antibody: biotinylated anti-rabbit 1:500 (Sigma Chemical co. USA) for 1 hour and Streptoavidine-peroxidase 1:150 for 1 hour (Sigma Chemical co. USA). After washing with PBS, it was revealed with 3,3-diaminobenzidine (Sigma, St Louis, USA) in 50mM TBS containing 0.1% hydrogen peroxide. Sections were counterstained with Harris's hematoxylin, mounted with Entellan (Merk, Germany) and observed by light microscopy (Nikon Eclipse 80i/Japan). Negative control sections were similar incubations except for omitting the primary anti-body.

2.7. Litter size and Morphometric analysis of the uterine arteries

Five animals of each experimental group were maintained until term with food and water *ad libidum*. After birth, litter size and pups body weight were recorded and macroscopic analysis was performed. For arterial wall and luminal diameter analyses it was performed a Harris's Hematoxylin-Eosin (H&E) staining protocol on 10 histological slides of each experimental group, and observed by light microscopy (Nikon Eclipse 80i/Japan) using a software of image analysis (NIS-Elements/Nikon/Japan). The total area (TA) and the luminal area (LA) of the arteries

were measured and the difference between TA and LA represents the arterial wall thickness.

2.9. Statistical Analysis

The study represents a completely randomized design (CRD), so the statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Scott -Knott test for mean comparison. When the pre-assumptions of normality and homoscedasticity were not met, the nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was applied. P values <0.05 were considered as indicative of significance.

3. Results

3.1. DBA+ uNK cells morphology

DBA+ uNK cells could be identified by the DBA lectin histochemistry as described by Paffaro Jr and colleagues [15] and demonstrated in figure 2. In the histological sections of implantation sites from LPS treated mice were observed a apparently large number of uNK cells DBA+ (Figure 2b) compare to the saline treated mice (Figure 2a). Additionally these LPS-treated mice presented clearly dilated blood vessels. The DBA+ uNK cells were well distributed at the Decidua Basalis and MLAp from each implantation sites in all experimental groups, allowing the identification of the four DBA+ uNK cells subtypes (Figure2C-2F) as described before. The DBA+ uNK cells from LPS-treated group presented alterations

regarding the DBA lectin reactivity as shown in Figure 2G, and the difficulty of identification using the normal patterns already described led us to classify them as altered DBA+ uNK cells.

The altered DBA+uNK cells presented granules of empty appearance and/or discontinuity DBA reactivity in their membranes and/or absence of reactivity for DBA in their granules.

3.2. DBA+ uNK cell stereology

To evaluate the DBA+ uNK cell subtypes distribution in embryo implantation sites (dg10) in each experimental group, it was performed the stereological analysis obtaining the density of the DBA+ uNK cell subtypes as described before [15,19], but including the altered uNK cells described in this paper. The distribution of these cells in each of the 3 region (Figure1) is represented in figure 3 and 4.

At the region 1, the subtype 1 DBA+ uNK cells (Figure3A) were found at the frequency of 5.05 cells/TA in control group. The Nimesulide Group presented similar number of cells 4.46 cells/TA ($p=0.6632$), however significantly higher number (13.44 cells/TA) of these cells were found in LPS-treated Group ($p=0.0002$). The pre-treatment with Nimesulide (3.33 cells/TA) blocked the increase in numbers caused by LPS ($p < 0.0001$). No differences in number of subtype 1 DBA+ uNK cells were found in region 2 and 3 comparing all groups (Figure3B and 3C).

In the Region 1, the distribution of subtype 2 DBA+ uNK cells (Figure3D) increased ($p=0.0465$) after LPS administration (8.91 cells/TA) comparing to Saline group (5.67 cells/TA) and it was prevented by pre-treatment with Nimesulide (4.89 cells/TA, $p= 0.0133$). No differences in number of subtype 2 DBA+ uNK cells were found in region 2 and 3 (Figure3E and 3F) comparing all groups ($p>0.05$).

There was a decrease ($p=0.0014$) in number of subtype 3 DBA+ uNK cells in region 1 (Figure3G) from LPS group (5.33 cells/TA) comparing with saline group (13.86 cells/TA). And this event could be prevented ($p=0.0046$) by Nimesulide pre-treatment (10.84 cells/TA). The same pattern was observed in region 2 and 3 (Figure3H and 3I), where the number of subtype 3 DBA+ uNK cells were higher ($p<0.0001$ and $p<0.0001$ respectively) in control group (6.21 cells/TA, and 6.80 cells/TA respectively) comparing to LPS treated group (3.99 cells/TA, and 2.48 cells/TA respectively). The reduction in number of this cell subtype in LPS Group could be blocked ($p=0.0013$, and $p<0.0001$ respectively) by Nimesulide pre-treatment (7.23 cells/TA, and 5.80 cells/TA respectively).

The subtype 4 DBA+ uNK cells (Figure3J – Figure3L) decrease in number in LPS treated group in regions 1, 2 and 3 (5.07 cells/TA, 3.69 cells/TA and 6.71 respectively) comparing ($p=0.0047$, $p=0.0002$ and $p<0.0001$ respectively) to control group (14.40 cells/TA, 13.5 cells/TA and 18.21 cells/TA respectively). The pre-treatment with Nimesulide prevented the decrease in number of subtype 4 DBA+ uNK cells in all regions (23.94 cells/TA, 18.64 cells/TA and 31.01cells/TA respectively) comparing with LPS group ($p<0.0001$ for all regions).

As demonstrated in Figure 3, no differences were found related to all subtypes in all regions between groups that received saline and nimesulide only, except for the presence of few altered DBA+ uNK in nimesulide group (Fig3M-O).

A substantial number of altered DBA+ uNK cells could be observed after LPS treatment in all regions (Figure 3M-O). In region 1 the abundant number of altered cells (27.95 cells/TA) in LPS group could not be prevented by pre-treatment with Nimesulide (27.83 cells/TA, $p=0.4816$). But in region 2 and 3 the pre-treatment was effective, reducing the number of altered cells from 63.64 cells/TA and 42.23 cells/TA to 10.53 cells/TA and 10.98 cells/TA ($p<0.0001$; for both regions).

3.3 Morphometric analysis of Uterine Arteries and Alpha-actin Immunohistochemistry

For the morphometric analysis of the uterine arteries, total area (TA = blood vessel wall + luminal area) and the luminal area (LA) of the arteries were measured and the difference between TA and LA represents the arterial wall thickness. As shown in figure 5A, there was no difference ($p=0.1516$) between groups that received saline ($4483.3\mu^2$) and nimesulide only ($3923.12\mu^2$). However, the LPS group presented thinner blood vessel walls ($2193.4\mu^2$) comparing to control ($p<0.0001$). Pre-treatment Nimesulide Group exhibited walls with thickness ($5360.81\mu^2$) similar to the control group ($p=0.3572$).

In saline and LPS treated group, conversely from that observed in negative control uterine sections (Figure 5C and 5F), the α -actin reaction was positive at myometrium and smooth muscle cells of the blood vessels from the myometrium and endometrium (Figure 5B and 5D). However, weak positive reaction could be

observed in LPS treated group comparing to saline group, especially in smooth muscle cells of blood vessels from endometrium.

3.4. Immunohistochemistry for perforin

The immunohistochemistry for perforin demonstrate specific and well located reaction in cytoplasmic granules of DBA+ uNK cells from saline group (Figure 6A; negative control in Figure 6B), although non-specific perforin reaction was observed in LPS treated group (Figure 6C; negative control in Figure 6D). Interestingly, the Nimesulide pre-treated group presented specific reaction in cytoplasmic granules of DBA+ uNK cells as observed in the control group (Figure 6E; negative control in Figure 6F).

3.5. Anxiety-like behavior analysis

The LPS is well known to establish in the host organism a group of behavioral changes called sickness behavior. To access whether the LPS was effective, it was performed the anxiety-like behavior analysis using the Elevated Plus-Maze test. As shown in Figure 7, the mice from LPS group presented a reduced time exploring the open arms (Fig.7A) comparing to the experimental group that received saline ($p=valor$) or Nimesulide only ($p=valor$), and increased time exploring the closed arms (Fig.7B) comparing with these 2 experimental groups ($p=valor$, $p=valor$ respectively). The anxiety-like behavior caused by LPS administration could not be blocked by pre-administration of Nimesulide ($p=valor$). A decrease in exploratory capacity was also observed in LPS group showed by a decrease in number of

entrance in open (Fig.7C) and closed arms (Fig.7D), which could not be prevented by pre-administration of Nimesulide.

3.6. Litter size and pups body weight

Considering the morphophysiological changes that occur in the mid pregnant uterus upon exposure to LPS, it is interesting to evaluate the quantity and quality of the offspring. As demonstrated in Figure 8, there was a decrease ($p=0.0002$) in number of pups born from dams that received LPS (3.6 pups) comparing with the group that received only saline (13 pups). Surprisingly, pretreatment with nimesulide was not only unable to reverse the effect of LPS but had an average of pups born even lower (0.6 pups). There were no differences in the average of pups body weight from all experimental groups except the Nimesulide+LPS group (2.104g) that was higher than control (1.846g, $p=0.0027$).

3.7. Elevated plus-maze test

To access whether the LPS and Nimesulide treatment could affect the anxiety-like behavior of pregnant mice (gd10), it was performed the elevated plus-maze test. As demonstrated in figure 9 no difference was found related to the time spend in open arms ($p= 0.1272$) and closed arms ($p=0.0645$) between saline (34.36s and 207.50s respectively) and nimesulide group (39.39s and 188,09s respectively). The LPS treatment caused an anxiety-like behavior establishment since the time spent in open arms (9.95s) was lower than control group (34.36s, $p<0.0001$), increasing the time spent in closed arms (260.88s) against control group (207.50s, $p<0.0001$).

Pre-treatment with Nimesulide could not prevent the anxiety-like behavior establishment since no difference was found related to the time spend in open arms ($p=0.1668$) and closed arms ($p=0.0558$) between LPS (9.95s and 260.88s respectively) and Nimesulide+LPS group (14.28s and 248.32s respectively).

The frequency of entries in open and closed arms ($p<0.0001$) in LPS-treated group (1.93 and 2.70 respectively) was lower than control group (11.25 and 11.22 respectively) which can reflect a decrease in exploratory capacity. The alteration in this parameter in LPS group could not be prevented by pre-treatment with Nimesulide (3.75 and 4.80 respectively) that still decreased comparing with control (11.25 and 11.22 respectively, $p<0.0001$).

4. Discussion

Uterine Natural Killer cells play a role in the massive degree of uterine vasculature remodeling that takes place in the early pregnancy, a critical process to ensure proper blood flow through the placenta and, therefore, adequate nutrition of the developing embryo [22].

In the present work we demonstrated that DBA+ uNK cells were well distributed in Decidua Basalis and MLAp as described by Paffaro Jr and colleagues [15] however, the inflammatory challenge promoted by LPS injection caused an increase in number of immature DBA+ uNK cells in region 1 of implantation sites. The region 1 is known as a high influx area of uNK cells precursors in normal pregnancy [15, 20], and we postulate that systemic inflammation during pregnancy can trigger immune cells mobilization increasing uNK cells influx to the uterine environment.

In all regions, the mature forms of DBA+ uNK cells (subtype III and IV) decreased in number after the induction of Systemic Inflammatory Response Syndrome by LPS injection concomitantly with the increase in number of altered uNK cells. These findings suggest that the main LPS-responsive forms are the mature subtypes of DBA+ uNK cells and the morphological alteration observed may be reflecting a functional change. In this context, the number and morphology of DBA+ uNK cells could be used as predictor for gestational complications in mice.

Interestingly, pre-treatment with Nimesulide could prevent the increase in number of immature DBA+ uNK cells as well as the decrease in number of mature subtypes concomitantly with the blockage of altered DBA+ uNK cells increase. This finding suggest that COX-2 is involved in the organism response by LPS-challenge.

Uterine Natural Killer cells are pivotal players in normal decidual angiogenesis and remodeling of spiral arteries (SA), the terminal branches of the major maternal uterine artery, and opening of placental circulation is achieved through mechanisms that include SA remodeling [48, 49].

This study demonstrates that pregnant mice from LPS group presented thinner endometrial blood vessel walls and its smooth muscle cells showed weak α -actin positive reaction. These results suggest that Systemic Inflammatory Response Syndrome induced in mice during mid pregnancy may cause disassembly of contractile filaments from uterine blood vessels smooth muscle cells, especially in the mesometrial region where uNK cells are located (Stewart and Peel, 1981; Paffaro Jr et al., 2003; Bulmer and Lash, 2005, Zavan et al 2012b).

The reduction process of blood vessels smooth muscle cells is a natural phenomenon of vascular remodeling in late pregnancy (Hazan et al., 2010) and in

this process uNK cells and macrophages play a role in blood vessels smooth muscle cells lyses, cell death and resorption (Hazan et al., 2010). Therefore, it seems reasonable to assume that LPS administration triggers the advance of blood vessels remodeling expected in late pregnancy (Zavan et al 2012b), increasing its permeability as well as the blood supply and possibly leukocyte homing to the uterine environment as a mechanism for restoring homeostasis after SIRS during pregnancy (Zavan et al 2012b).

According to the literature, uNK cells can participate in the process of uterine SA remodeling not only by the angiokines production but also through perforin releasing [Lima et al 2014] by a perforin-mediated smooth muscle cell death that has been already suggested in other models [Henderson et al 1999, Lima et al 2014]. Here we demonstrate that uNK cells no longer express perforin within their granules after 2h of LPS injection suggesting that the LPS challenge can trigger the perforin release by uNK cells, concomitantly with α -actin down regulation from uterine blood vessels smooth muscle cells. The pretreatment with Nimesulide could prevent LPS-triggered perforin releasing as well as α -actin down regulation.

The LPS is well known to establish in the host organism a group of behavioral changes called sickness behavior [45-47, Hart 1988]. To assess whether the LPS was effective, it was performed the anxiety-like behavior analysis. As expected, the LPS was anxiogenic as demonstrated by others [45-47?] but here, for the first time it was demonstrated to generate the same effect in mice during mid pregnancy. In the present study, COX-2 inhibition could not prevent the anxiety-like behavior establishment; therefore, this event appears to be mediated by pro-inflammatory cytokines or COX-1. As suggested by others, selected LPS-induced behavioral changes in normal, healthy mice is due to COX-1, and not COX-2 (Teeling et al.

2010), but better understanding of the biological pathways by which systemic inflammation influences brain function in health and disease may lead to novel or improve therapeutic strategies (Teeling et al. 2010).

The reflection from the results discussed so far might lead us to believe that inhibition of COX-2 may be beneficial in an inflammation condition during pregnancy as it prevents the excessive influx of immature uNK into the uterus, the decrease of mature subtype of uNK cells concomitantly with the prevention of the increasing in number of altered uNK cells. It also prevented perforin releasing by these cells and the decreasing of α -actin in uterine blood vessels.

However, the number of pups born from dams treated with Nimesulide+LPS in mid pregnancy was even lower than the number of pups born from those that received only LPS in the same gestation day. The injection of nimesulide alone caused no effect, leading us to believe that the physiological changes after LPS-induced inflammation are of fundamental importance for the uterine homeostasis reestablishment in order to maintain pregnancy to term. The impairment of the organism response to the Systemic Inflammatory Response Syndrome in mid pregnancy using a COX-2 inhibitor is deleterious to fetal development; in the meantime, more studies are required to elucidate the mechanisms involved in this process.

5. References

[1] Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol Rev* 2006; 1(4): 161-85.

- [2] Benirschke K. Placentation. *J Exp Zool* 1983; 228:385-9.
- [3] Croy BA, Chen Z, Hofmann AP, Lord EM, Sedlacek AL & Gerber SA 2012 Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. *Biol Reprod* 87 125.
- [4] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931–10934, 1992.
- [5] Aasa KL, Kwong KK, Adams MA & Croy BA. Analysis of maternal and fetal cardiovascular systems during hyperglycemic pregnancy in the nonobese diabetic mouse. *Biol Reprod* 2013; 88 151.
- [6] Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C & Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev Biol* 2002; 250 358-373.
- [7] Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009;30:473e82.
- [8] Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006;27:939e58
- [9] Harris LK. IFPA Gabor Than Award lecture: Transformation of the spiral arteries in human pregnancy: key events in the remodeling timeline. *Placenta*. 2011; 2:S154-8.
- [10] Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, Luther JS, Wallace JM, Wu G, Spencer TE. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol* 572: 51–58, 2006.

- [11] Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod.* 1991;6(6):791-8.
- [12] King A & Loke YW 1991 On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 12 432-435.
- [13] Peel S: Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1989; 115:1–112.
- [14] Moffett-King A (2002) Natural killer cells and pregnancy *Nature Reviews Immunology.* 2: 656–663
Immunol 31 387-411
- [15] Paffaro-Jr VA, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta* 2003;24:479–88
- [16] Peel S. Granulated metrial gland cells. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1989;115:1–112.
- [17] Zhang JH, Yamada AT, Croy BA. DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. *Placenta*2009;30:968–73.
- [18] Yamada A.T., Bianco J.R., Lippe E.M.O., Degaki K.Y., Dalmorin A.F., Edwards A.K., Lima P.D.A., Paffaro Jr V.A., Unique Features of Endometrial Dynamics During Pregnancy. In Croy B.A., Yamada A.T., DeMayo F.J., Adamson S.L. editors. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (2014). p. 163-173.
- [19] Zavan B, Carvalho CC, Rossi Jr WC, Paffaro AMA, Paffaro Jr VA (2012) Splenectomy delays uterine Natural Killer cell recruitment to implantation sites and prolongs pregnancy in mice. *Anat Rec* 295: 1221-1228.

- [20] Wang C, Umesaki N, Nakamura H, Tanaka T, Nakatani K, Sakaguchi I, Ogita S & Kaneda K. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res* 2000; 300, 285-293.
- [21] Li G, Huang W, Xia Q, Yang K, Liu R, Zhu H & Jiang W 2008 Role of uterine natural killer cells in angiogenesis of human decidua of the first-trimester pregnancy. *Sci China C Life Sci* 51 111-119.
- [22] Erlebacher A 2013 Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev*
- [23] Croy BA. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? *J Reprod Immunol* 1999;42:127-9.
- [24] Chen Z, Zhang J, Hatta K, Lima PD, Yadi H, Colucci F, et al. DBA-Lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. *Biol Reprod* 2012;87(4):1-9.
- [25] Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, et al. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol* 2007;178(7):4267-75.
- [26] Degaki KY, Chen Z, Yamada AT, Croy BA 2012 Delta-Like Ligand (DLL)1 Expression in Early Mouse Decidua and Its Localization to Uterine Natural Killer Cells. *PLoS ONE* 7(12): e52037. doi:10.1371/journal.pone.0052037.
- [27] Hatta K, Carter AL, Chen Z, Leno-Durán E, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG, et al. Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells. *Reprod Sci* 2011;18(4):383-90.

- [28] DOUGLAS, A. J. Baby on board: do responses to stress in the maternal brain mediate adverse pregnancy outcome? *Front Neuroendocrinol*, Edinburgh, v.31, p. 359-376, 2010.
- [29] Ajmone-Cat MA, De Simone R, Nicolini A, Minghetti L. Effects of phosphatidylserine on p38 mitogen activated protein kinase, cyclic AMP responding element binding protein and nuclear factor-kappaB activation in resting and activated microglial cells. *J Neurochem*. 2003 Jan;84(2):413-6
- [30] Dai JN, Zong Y, Zhong LM, Li YM, Zhang W, Bian LG, Ai QL, Liu YD, Sun J, Lu D. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways. *PLoS One*. 2011;6(7):e21891. doi: 10.1371/journal.pone.0021891. Epub 2011 Jul 12.
- [31] Fu SP, Li SN, Wang JF, Li Y, Xie SS, Xue WJ, Liu HM, Huang BX, Lv QK, Lei LC, Liu GW, Wang W, Liu JX. BHBA Suppresses LPS-Induced Inflammation in BV-2 Cells by Inhibiting NF- κ B Activation. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:983401. doi: 10.1155/2014/983401. Epub 2014 Apr 6.
- [32] Casado M, Díaz-Guerra MJ, Boscá L, Martín-Sanz P. Differential regulation of nitric oxide synthase mRNA expression by lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines in fetal hepatocytes treated with cycloheximide. *Biochem J*. 1997 Nov 1;327 (Pt 3):819-23
- [33] W.L. Smith, R.C. Murphy, The eicosanoid: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways, in: D.E. Vance, J.E. Vance (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th ed., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002, pp. 341–371.

- [34] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 149–182.
- [35] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 149–182.
- [36] M. Murakami, H. Naraba, T. Tanioka, et al., Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32783–32792.
- [37] D.O. Stichtenoth, S. Thoren, H. Bian, M. Peters-Golden, P.J. Jakobsson, L.J. Crofford, Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells, *J. Immunol.* 167 (2001) 469–474.
- [38] J.A. Mancini, K. Blood, J. Guay, et al., Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4469–4475.
- [39] S. Thoren, P.J. Jakobsson, Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6428–6434.
- [40] M. Reilly, G.A. Fitzgerald, Cellular activation by thromboxane A2 and other eicosanoids, *Eur. Heart J.* 14 (Suppl K) (1993) 88–93.
- [41] J.L. Mills, R. DerSimonian, E. Raymonf, et al., Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study, *JAMA* 282 (1992) 356-362.

[42] S.W. Walsh, Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J. Obstet. Gynecol.* 152 (1985) 335-340.

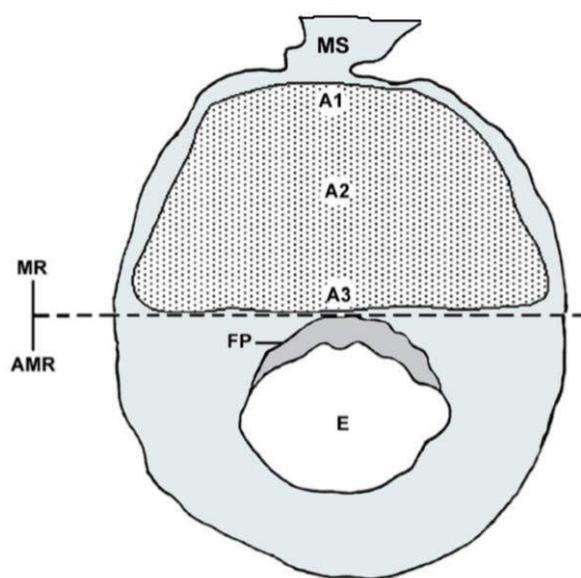


Figure 1 Line diagram of embryo implantation site at gd10 indicating areas A1, A2 and A3 from mesometrial side where the uNK were quantified. Mesometrium (MS), Mesometrial region (MR), Anti-mesometrial region (AMR), Embryo (E), Fetal Placenta (FP).

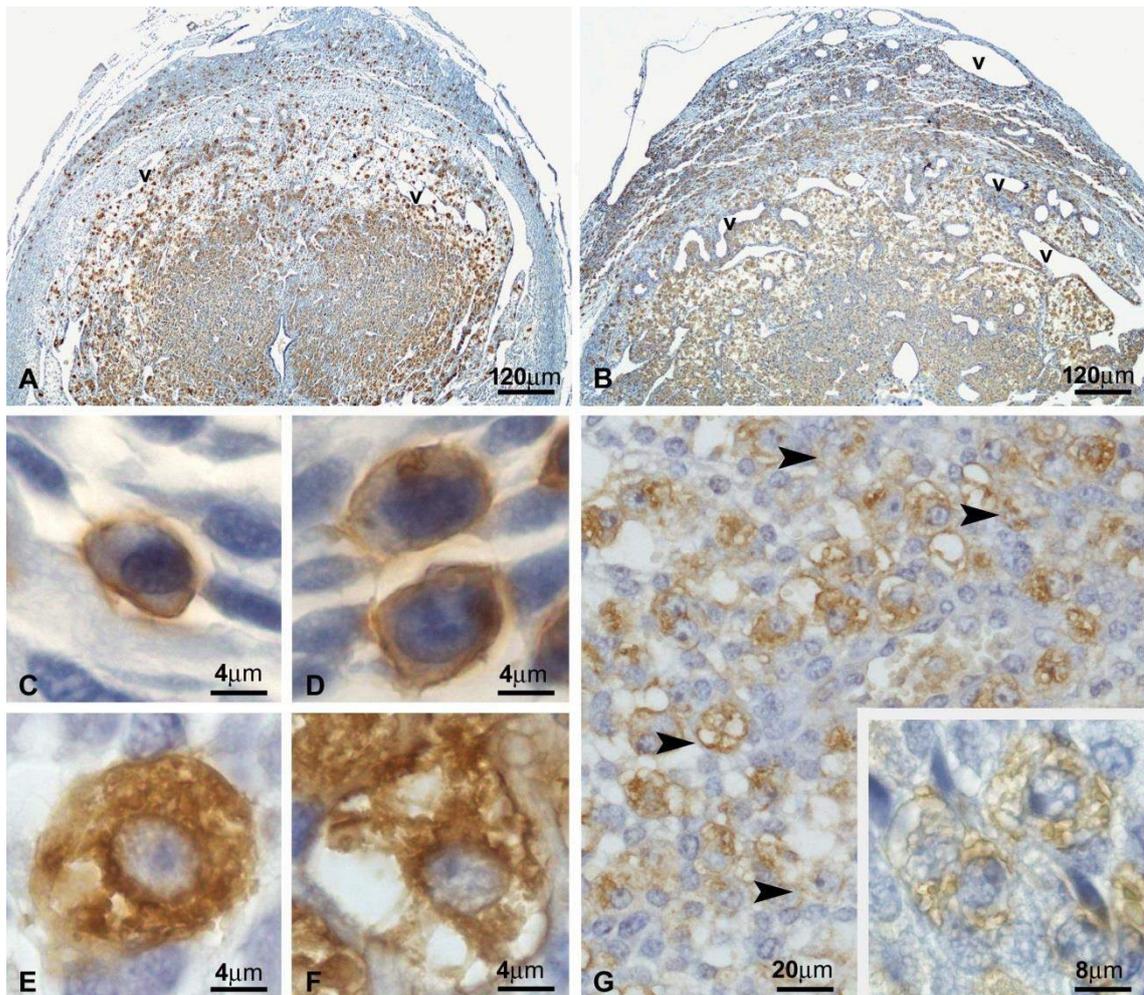


Figure 2. Histological sections of mouse implantation sites at gd10 after DBA lectin histochemistry. Mesometrial region of the implantation site from normal mice (A) and after LPS treatment (B). The reaction allowed the identification of 4 subtypes of DBA⁺ uNK cells (C-F) as well as the new classified DBA⁺ uNK cells called altered uNK cells (G - head arrows; detailed at the insert). DBA Lectin / DAB-peroxidase / Harris Haematoxylin.

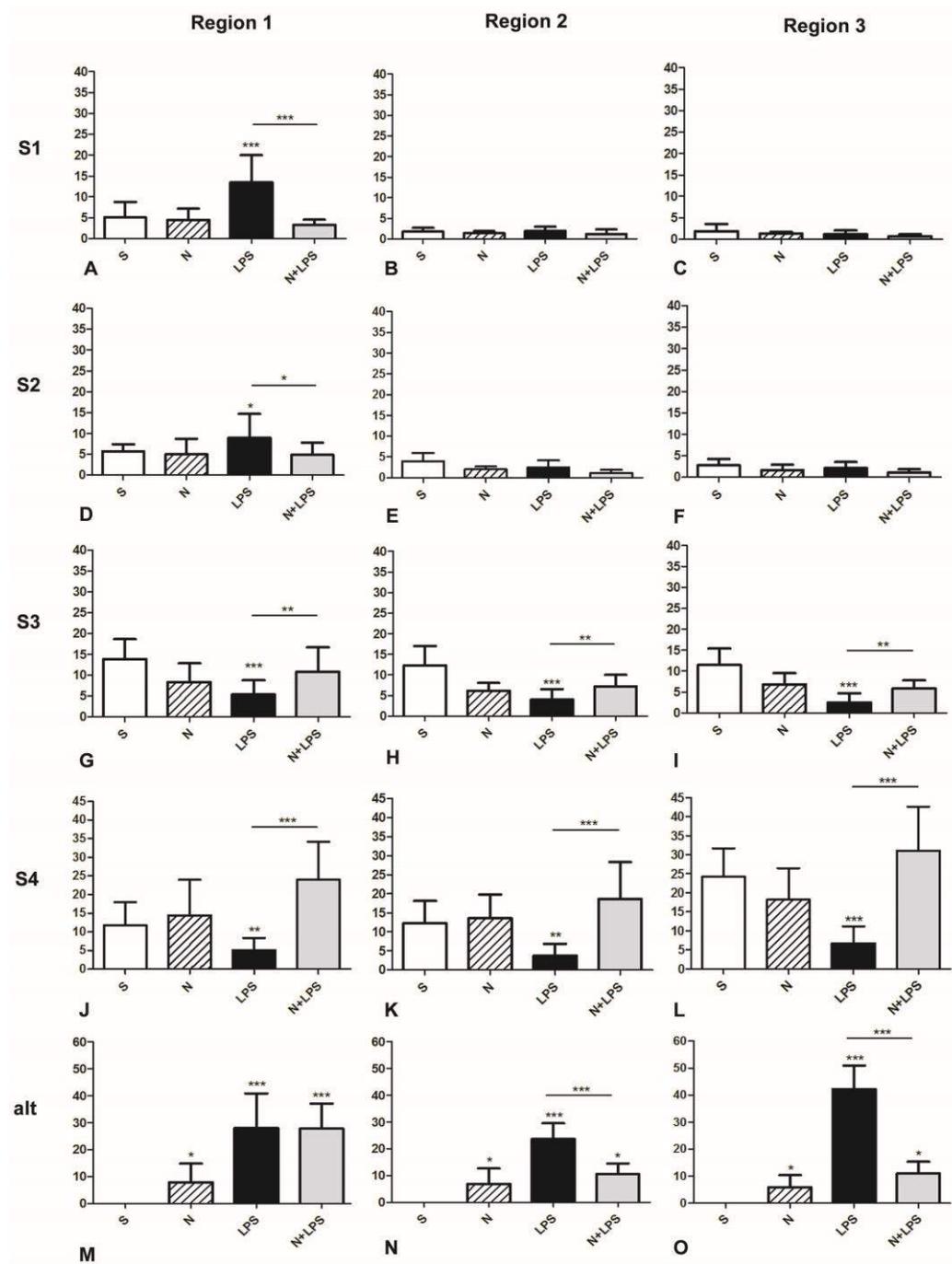


Figure 3. Quantification of 4 DBA⁺ uNK cell subtypes (S1-4) and the altered uNK cell (alt) in each of the three regions of the gd10 embryo implantation site from each experimental groups: saline (S), Nimesulide (N), LPS, and Nimesulide + LPS (N + LPS).

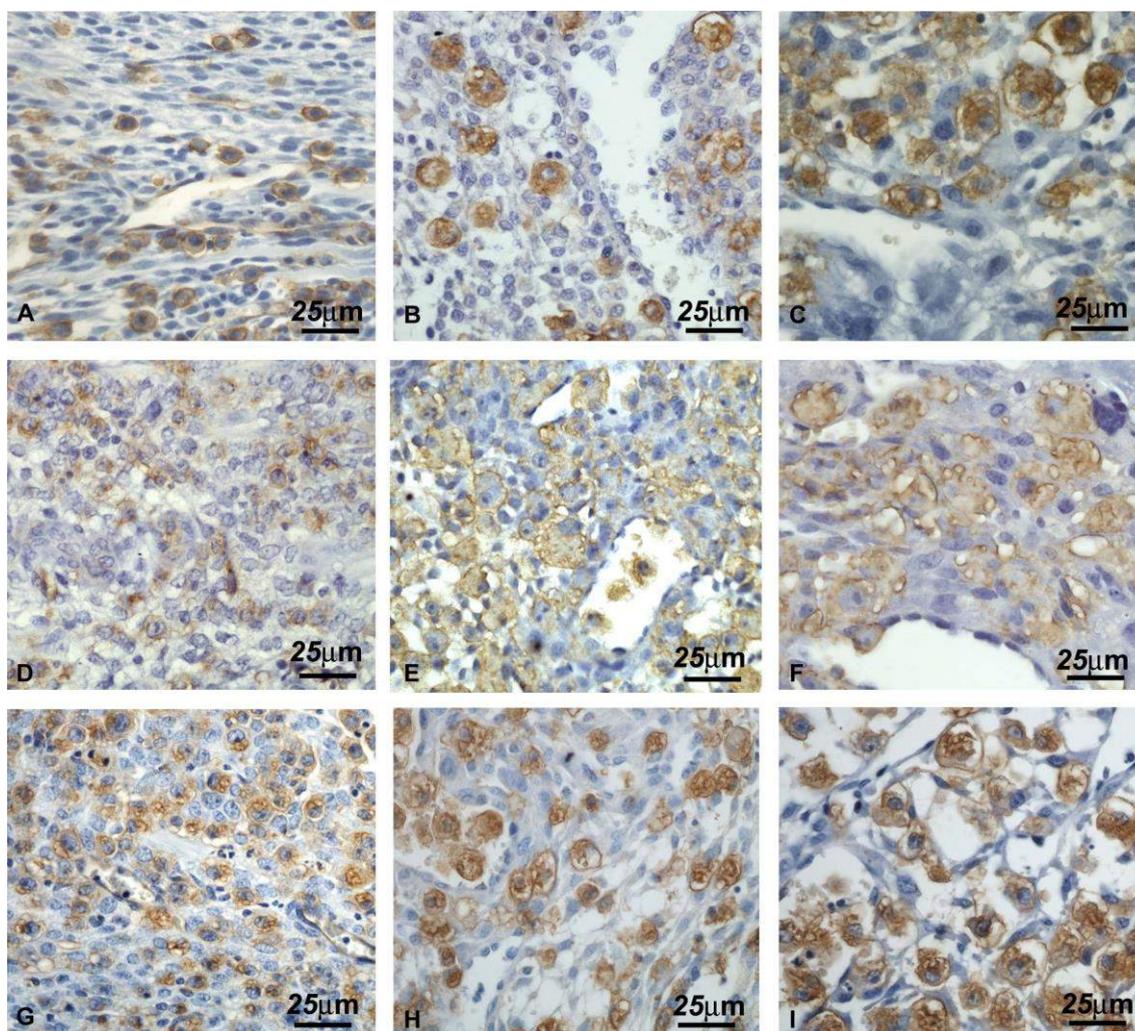


Figure 4. Histological sections of gd10 mouse implantation sites after DBA lectin cytochemistry. Region 1 (A), Region 2 (B) and Region 3 (C) of the implantation site from control group showing normal DBA⁺ uNK cells. Region 1 (D), Region 2 (E) and Region 3 (F) of the implantation site of the LPS treated group showing altered DBA⁺ uNK cells. Region 1 (G), Region 2 (H) and Region 3 (I) of the implantation site from nimesulide pre-treated group showing DBA⁺ uNK cells similar to those observed in the control group. Lectin DBA / DAB-peroxidase / Harris Haematoxylin.

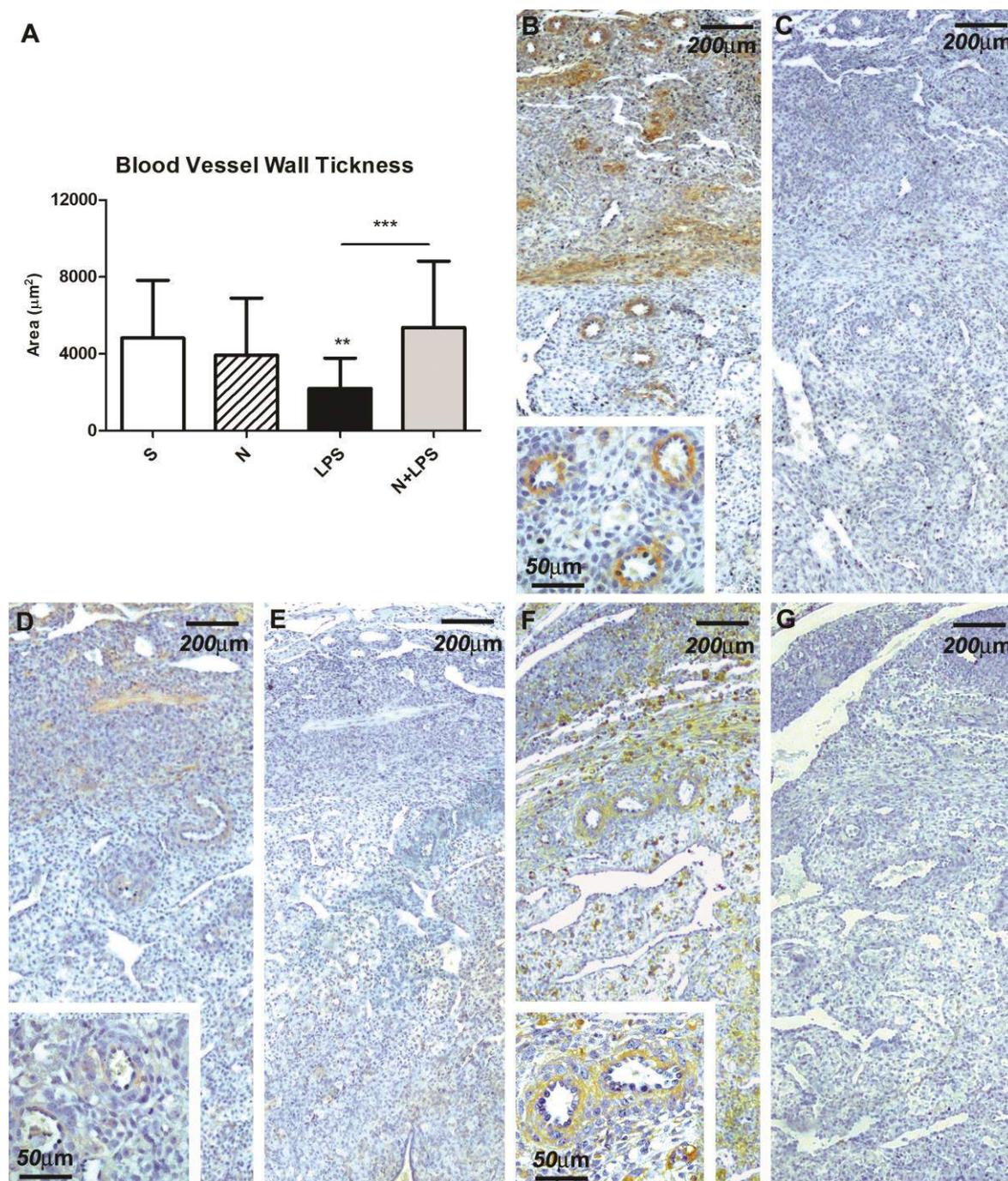


Figure 5. Morphometric analysis of the uterine arteries thickness from all experimental groups (A). Histological sections of dg10 implantation sites after α -actin immunohistochemistry from control group (B) showing strong positive reaction at smooth muscle cells of blood vessels (insert); negative control reaction from control group (C); LPS treated group (D) showing weak positive reaction at smooth muscle cells of blood vessels (insert); Negative control reactions from LPS group (E). Immunohistochemistry for α -actin-peroxidase / Harris Haematoxylin.

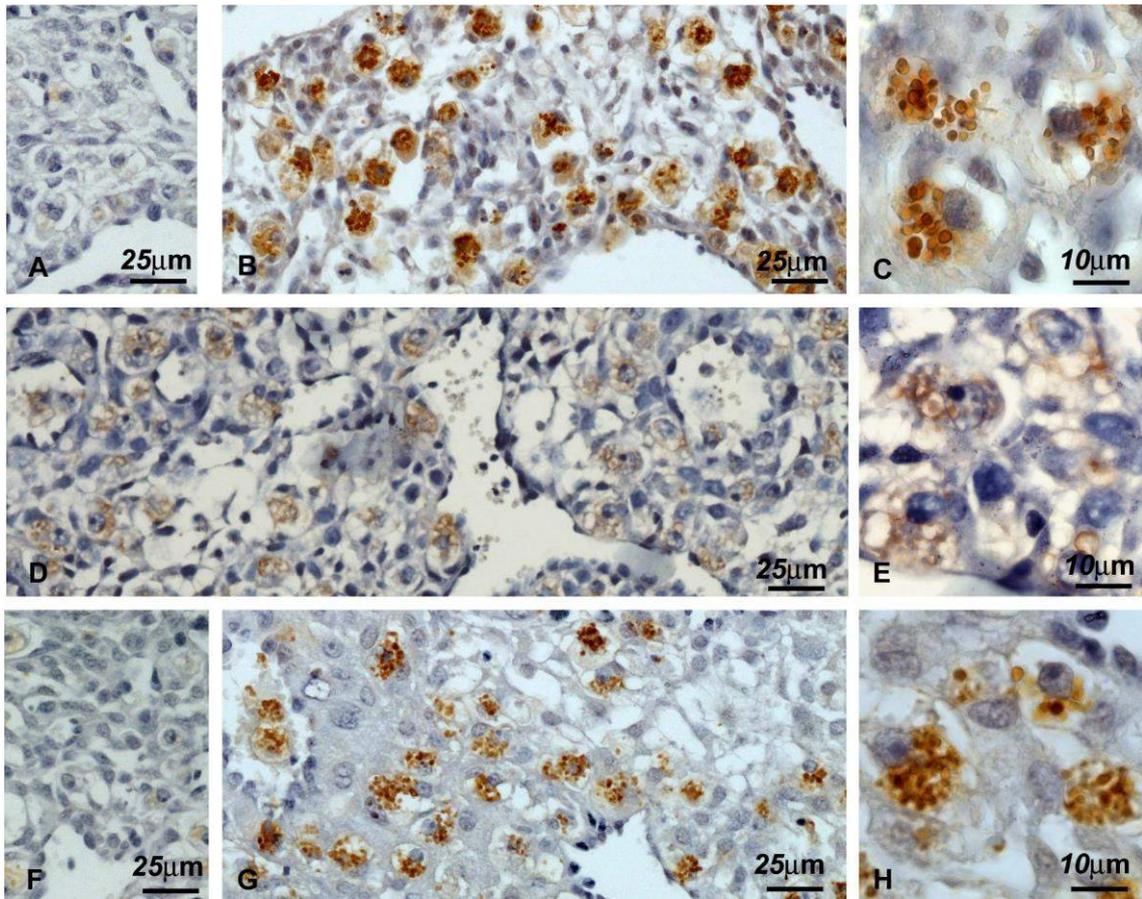


Figure 6. Histological sections of gd10 implantation sites after perforin immunohistochemistry: negative control reaction (A), positive reaction to perforin in uNK cells from saline group (B) and the specific reaction at cytoplasmic granules of uNK cells (C). Perforin loss from LPS treated group (D) and the loss of reaction at granules (E). Negative control reactions from nimesulide pre-treated group (F); Positive reaction from nimesulide pre-treated group (G) and the specific reaction at cytoplasmic granules of uNK cells (H). Immunohistochemistry for perforin-peroxidase / Harris Haematoxylin.

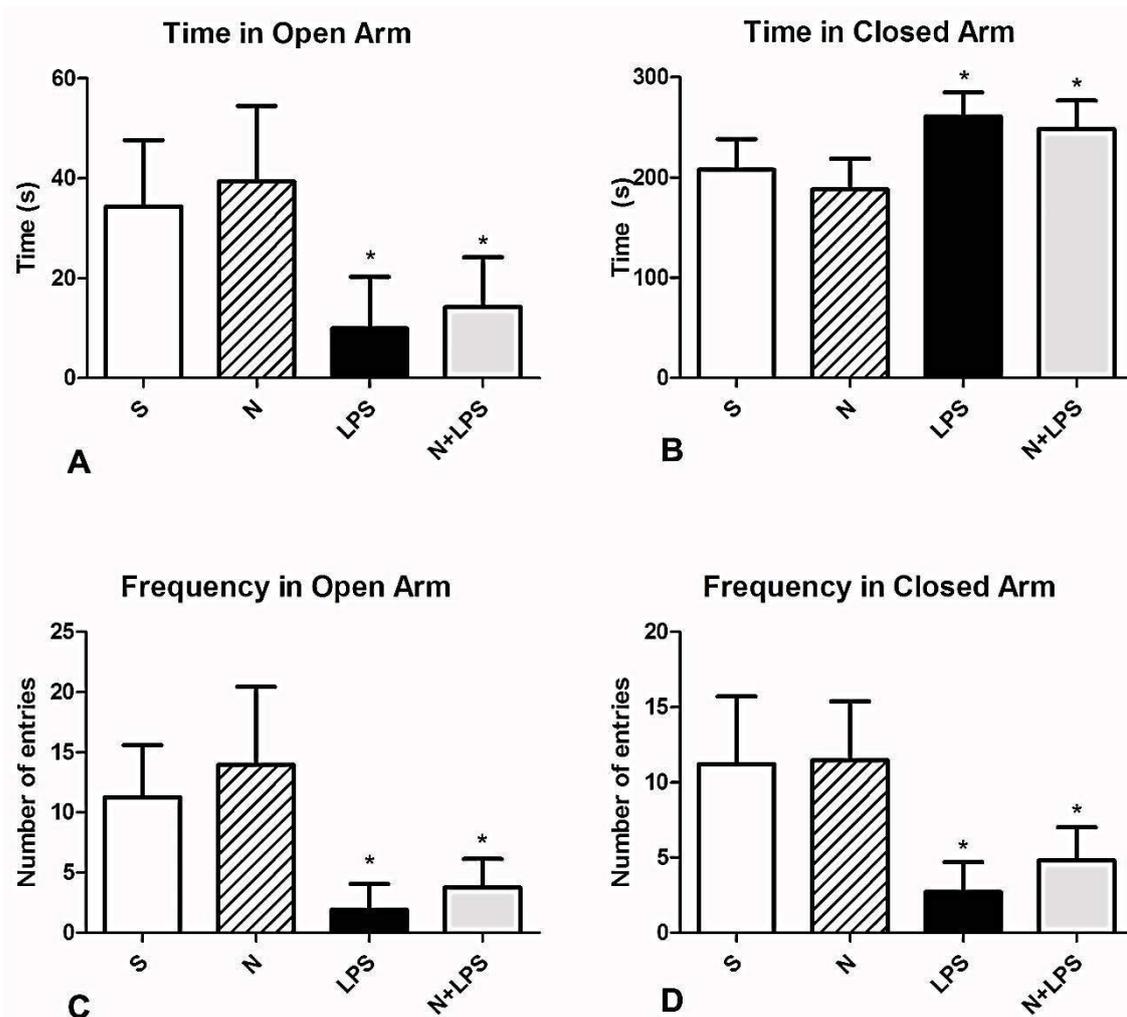


Figure 7. Elevated Plus Maze test to anxiety-like parameters analysis: time spent in the open arm (A) and closed arm (B); Time spent in the open arms (C) and closed arms (D). (S = saline, N = Nimesulide, LPS, LPS + N = Nimesulide + LPS).

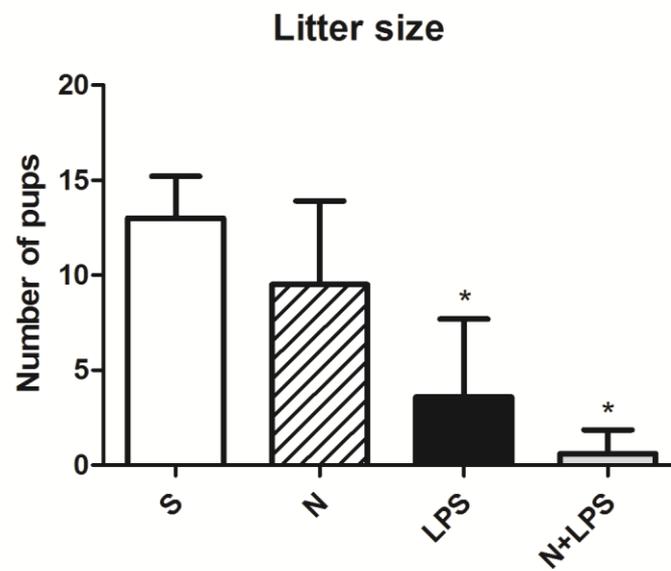


Figure 8. Litter size graph showing average number of offspring per animal from each experimental group (S = Salina, N = Nimesulide, LPS, LPS + N = Nimesulide + LPS).

ANEXO IV

Placental Growth Factor Influences Maternal Cardiovascular Adaptation to Pregnancy in Mice¹

Running Title: PGF affects gestational cardiovascular adaptation

Kristiina L. Aasa,^{2,3} Bruno Zavan,^{3,4} Rayana L. Luna,^{3,5} Philip G. Wang,³ Nicole M. Ventura,³ M. Yat Tse,³ Peter Carmeliet,^{6,7} Michael A. Adams,³ Stephen C. Pang,³ and B. Anne Croy³

³Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston ON Canada

²Department of Cell, Tissue and Developmental Biology, Federal University of Alfenas, Alfenas MG, Brazil

⁵Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, Brazil

⁶Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular Link, Vesalius Research Center, VIB, Leuven, Belgium

⁷Laboratory of Angiogenesis and Neurovascular Biology, Vesalius Research Center, Department of Oncology, University of Leuven, Leuven, Belgium

¹This work was supported by awards from NSERC, CIHR, CFI and the Canada Research Chairs Program to BAC, and by training fellowships from CAPES' Science without Borders Program (B.Z., R.L.) and the R.S. McLaughlin Fellowship, Queen's University (K.L.A.). The work of PC is supported by the Belgian Science Policy (IAP #P7/03); Leducq Network of Excellence; the Belgian Science Fund (FWO) and long-term structural Methusalem funding by the Flemish Government. Presented in part at the 2013 International Federation of Placenta Associations Meeting, September 11-14, Whistler, Canada.

² Correspondence: Kristiina Aasa, Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston ON Canada K7L 3N6. E-mail: 8kla@queensu.ca

ABSTRACT

In healthy human pregnancies, placental growth factor (PGF) concentrations rise in maternal plasma during early gestation, peak over weeks 26-30, then decline. Since PGF in non-gravid subjects participates in protection against and recovery from cardiac pathologies, we asked if PGF contributes to pregnancy-induced maternal cardiovascular adaptations. Cardiovascular function and structure were evaluated in virgin, pregnant and postpartum C56BL/6-*Pgf*^{-/-} (*Pgf*^{-/-}) and C57BL/6-*Pgf*^{+/+} (B6) mice using plethysmography, ultrasound, qPCR and cardiac and renal histology. *Pgf*^{-/-} females had higher systolic blood pressure in early and late pregnancy but an extended, abnormal midpregnancy interval of depressed systolic pressure. *Pgf*^{-/-} cardiac output was lower than gestation day (gd)-matched B6 after mid-pregnancy. While *Pgf*^{-/-} left ventricular mass was greater than B6, only B6 showed the expected gestational gain in left ventricular mass. Expression of vasoactive genes in the left ventricle differed at gd8 with elevated *Nos* expression in *Pgf*^{-/-} but not at gd14. By gd16, *Pgf*^{-/-} kidneys were hypertrophic and had glomerular pathology. This study documents for the first time that PGF is associated with the systemic maternal cardiovascular adaptations to pregnancy.

Summary Sentence: This paper demonstrates an association between placental growth factor and maternal gestational cardiovascular adaptation.

Keywords: Cardiac remodeling; Cardiovascular risk; Fetal growth; Placenta; Ultrasound

INTRODUCTION

Placental growth factor (PGF) is a member of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family [1] with important cardioprotective roles [2-4]. PGF has prominent, specific roles in cardiac stress and disease that have made it an attractive therapeutic candidate [2, 3]. Research into infarcted and pressure-loaded hearts identified the importance of PGF in adaptive hypertrophy and in promotion of angiogenesis; PGF deficits in the diseased heart are strongly correlated with diminished prognosis for repair and survival [2-4].

Pregnancy is physiologically challenging to the maternal cardiovascular (CV) system [5]. Typical pregnancy induces gains in blood volume [6] and cardiac output (CO), transient cardiac hypertrophy [6, 7] and vessel restructuring across the decidualized endometrium. Decidual vascular restructuring includes early neoangiogenesis and later spiral arterial remodeling [8], processes influenced by PGF [9, 10]. Plasma PGF concentrations fluctuate in women over pregnancy, increasing from 1st trimester, peaking at 26-30 weeks and declining towards term [1, 11]. We postulated that gestational elevations in PGF participate in the normal functional adaptations of the maternal heart to pregnancy.

PGF executes its angiogenic properties primarily through binding with high affinity to VEGFR1 (also known as FLT1) [1]. VEGFA also binds to this receptor but with lower affinity and can be displaced by PGF. Displacement of VEGFA increases its bioavailability and ability to drive the major pathway for angiogenesis through binding to VEGFR2 [9, 12]. Humans have four PGF isoforms [12, 13], whereas, mice express a single *Pgf2* gene homologue [14]. *Pgf*^{-/-} mice have been available for a number of years. Since *Pgf*^{-/-} x *Pgf*^{-/-} matings produce viable litters, containing normal numbers of pups [3, 9], PGF has generally been considered redundant during development [14]. To address whether PGF has a role in maternal cardiac adaptations to pregnancy, we quantified PGF in the plasma of normal mice over pregnancy. Since the time course for the pattern of detection resembled that of human pregnancy, we proceeded to compare the CV systems of C57BL/6-*Pgf*^{-/-} (*Pgf*^{-/-}) females mated by *Pgf*^{-/-} males to C57BL/6-*Pgf*^{+/+} (B6) females mated by B6 males over pregnancy using plethysmography and ultrasound. These studies, supported by gross and histological studies of the maternal heart and kidney and by analysis of expression of targeted genes in the left ventricles (LV) of late gestational females, implicate the dynamic, gestational elevation of PGF in maternal plasma in maternal CV adaptations to pregnancy.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

B6-*Pgf*^{-/-} mice were bred at Queen's University from foundation stocks provided by P. Carmeliet [15]. Female and male B6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and used as controls. A total of 78 females (n=39/ genotype) were used in this study. Animal usage was conducted in accordance with the SSR's specific guidelines and standards and under protocols approved by the Queen's University Animal Care Committee that were in accordance with the Canadian Council on Animal Care's Guide to the Care and Use of Experimental Animals.

At 11-16 wk of age, females were paired with a male; detection of a copulation plug the following morning was considered gestation day (gd)0.

ELISA

PGF-2 concentrations were measured by Quantikine ELISA (R&D Systems; Cedarlane, Burlington ON) in undiluted, citrated plasma samples collected by cardiac puncture in anaesthetized virgin, gd-matched and 30 days postpartum (PP) *Pgf*^{-/-} and B6, using n=3-5 females/genotype/time-point. Plasma samples were assessed as individual animals run in duplicate with means of the duplicates used for analyses. The assay was performed according to manufacturer's instructions.

Arterial pressure recordings

Due to cerebral vascular complications that included an incomplete circle of Willis [16], assessment of arterial pressure could not be conducted by radiotelemetry [17]. From a large study of *Pgf*^{-/-} males and females on B6 and 129/SvJ strain backgrounds, only two 129/SvJ females were successfully recorded. These females mated and their gestational recordings are included as Supplemental Figure S1 (Supplemental Data are available online at www.biolreprod.org) to support data on the impact of PGF deficiency collected by plethysmography. Baseline tail cuff recordings of systolic pressure were obtained (Coda High Throughput 4 chamber, Kent Scientific Corp) from *Pgf*^{-/-} (n=3) and B6 (n=4) females pre-trained to the instrument for 14d. Baseline pressure for each animal was averaged from 5-10 days of recordings after pre-training but prior to pregnancy. These females were subsequently mated and blood pressures were serially recorded on each day of pregnancy. Recordings included 25 cycles and machine acceptable measurements were subjected to outlier analyses and the remaining values were averaged for each animal for each day and normalized to baseline values for statistical analysis.

Ultrasonography

The Vevo770 high-frequency ultrasound system (VisualSonics, Toronto, Canada) was used to evaluate maternal CV function in anaesthetized virgin and pregnant (gds 8,10,12,14,16 and 18) *Pgf*^{-/-} and B6 females (n=3-5dams/genotype studied at each time-point). Each female was studied on only one gd (i.e. not followed serially) to permit postmortem collection of tissues that could be directly related to the sonographic findings. Animals were anaesthetized using 5% inhaled isoflurane in oxygen and maintained at 1.5-2% during sonography. The Vevo707B 30MHz transducer was used for M-Mode cardiac scanning to obtain structural and physiological data. Parasternal long axis views of the heart were used with sample volume placed perpendicular to the aorta and through the left ventricle (LV) at a mid-papillary section to ensure consistency in measurement position between animals (Supplemental Figure S2). The Vevo704 40MHz transducer was used to perform renal, uterine and umbilical arterial scans. Pulsed-Wave (PW) Doppler measurements were obtained using an angle of insonation of less than 60° from uterine and renal arteries. Renal artery Resistance Index (RI) was calculated as $RI = \frac{\text{peak systolic velocity} - \text{end diastolic velocity}}{\text{peak systolic velocity}}$. Between gd10-18, as permitted by litter size and fetal development, 3-5 fetuses from each dam were located and fetal heart rates, umbilical artery peak velocities and umbilical artery RI were measured.

Postmortem organ wet-weights

Following ultrasonographic study, animals were euthanized by sodium pentobarbitol overdose (CEVA Sante Animale) (50mg/kg), exsanguinated by cardiac puncture and dissected.

Hearts were removed and weighed intact. The heart chambers were then dissected, weighed individually and snap frozen in liquid nitrogen for gene expression studies. Right hind limbs were dissected, digested overnight in 0.2M NaOH at 60°C and then tibia length was measured using digital calipers. Tibia lengths were constant during pregnancy and did not differ between genotypes ($p=0.17$) and, therefore, were used for normalization of heart weight to body size of each mouse. Both kidneys were freed of adhering adipose tissue and weighed. Fetal weights were obtained after removal of the amniotic sac, placenta and umbilical cord. Live pup weights were obtained on PP day 4, prior to euthanasia.

Histological and morphometric analyses

A separate cohort of virgin and gd16 *Pgf*^{-/-} and B6 mice ($n=3$ /genotype/ time-point) was used exclusively for histological studies. These mice were euthanized and perfusion-fixed (transcardiac) with potassium-based perfusion buffer (140mM NaCl, 10mM KCl, 5mM EDTA) [18] for 5min (1mL/min.) followed by 4% neutral buffered paraformaldehyde (PFA) for 5min (1mL/min) using a constant flow pump. Hearts and right kidneys were then removed, further fixed by overnight immersion in PFA, then processed for paraffin-embedding. Parasternal short axis cardiac (6 μ m) and coronal renal sections (2 μ m) were cut and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Sections were digitized and analyzed using standard light microscopy and Zeiss AxioVision Software. For each heart, maximum LV chamber area and exterior wall thickness were measured. For each kidney, 10 randomly selected renal corpuscles were identified and photographed. Surface areas of each corpuscle and glomerulus were measured. Subtraction of the latter was used to estimate Bowman's space. Glomerular cellularity was estimated by counting endothelial cell numbers.

Immunohistochemistry (IHC) for NOS2 and NOS3 was performed on a second cohort of perfusion-fixed B6 and *Pgf*^{-/-} hearts at virgin, gd8 and gd14. Paraffin-embedded hearts were cut at 6 μ m and a diaminobenzidine chromogen protocol was used. Slides were incubated with 3% bovine serum albumin buffer and antigen retrieval was performed using citrated buffer under humid conditions for 30min. Primary antibodies were purchased from ABCam (Rabbit polyclonal antibody against iNOS; 1:200 dilution) and Santa Cruz Biotechnologies (Rabbit polyclonal antibody against eNOS; 1:100 dilution). Secondary antibody used for both was purchased from Vector Laboratories (Biotinylated goat anti-Rabbit IgG; 1:200 dilution). Sections were counterstained with Hematoxylin. Negative control consisted of an isotype control in place of primary antibodies; no staining resulted. Image analysis was performed by pixel quantification using image analysis software (GIMP 2.8.10).

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from snap frozen LV samples from virgin, gd8 and gd14 females (previously used for ultrasound studies) using the high-pure tissue RNA isolation kit (Roche Scientific Co) and an established, modified protocol [19]. RT of total RNA was then performed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) and manufacturer's instructions. Relative mRNA expression was measured in triplicate and means reported relative to *Gapdh* mRNA using qPCR (Roche Lightcycler 480 II). Primers were designed using published GenBank sequences and Primer Designer Software version 2.01 (Scientific and Educational Software). Primer sequences and standard curve efficiencies are given in Supplemental Table S1.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 Statistical Software (GraphPad). PGF ELISA analysis in detectable mice (B6 only) was performed using one-way ANOVA; differences between gd were determined by Tukey's post-test. Comparisons between $Pgf^{f/-}$ and B6 genotypes across gestation were performed using two-way ANOVA and differences at specific gd were tested using Bonferroni's post-test and data set-up as $Pgf^{f/-}$ vs B6. Data are presented as mean \pm standard error (SEM), using n=3-5 dams/group. Differences were defined as significant at $p \leq 0.05$. Regression analysis was used to determine differences in changes over time, with a significantly non-zero slope considered a change. Morphometric analysis between groups (virgin vs gd16) was performed using Student's t-test.

RESULTS

Maternal plasma PGF concentrations fluctuate over gestation

Plasma PGF levels were measured in virgin, pregnant and 30 days PP $Pgf^{f/-}$ and B6. PGF was not detected in any $Pgf^{f/-}$ sample. PGF levels in virgin and PP B6 were detectable but very low; significantly higher levels were detected in all pregnant B6 samples. PGF concentrations rose to gd 10-14 (statistically similar) then declined. PGF concentrations in B6 females were highest at gd10; this was the only time-point that showed a statistically significant increase from virgin levels. Gd10 levels were not significantly higher than levels at gd14; however, levels were higher than all other time points measured (Figure 1).

MAP over gestation

In virgin $Pgf^{f/-}$, systolic arterial pressure (SAP) was elevated relative to B6 females (Figure 2A). This was also true in late gestation (Figure 2A). However, the overall pattern of change in $Pgf^{f/-}$ SAP was similar to B6. That is, SAP dropped from pre-conception baseline after gd6 with a gd9 nadir. B6 recovery to baseline pressure was achieved by gd12 but was delayed in $Pgf^{f/-}$. Differences in SAP (delta from baseline) over pregnancy increased in a non-statistically significant manner in $Pgf^{f/-}$ compared to B6 dams ($p=0.055$; Figure 2B). When raw data were segregated into previously determined phases of embryonic and placental development thought to influence blood pressure [17], differences between groups were significant in Phase 1 (gd0-5, extent of the drop in SAP) and Phase 4 (gd15-18, extent of the rebound) ($p=0.0002$ and $p=0.047$, respectively). In both phases, $Pgf^{f/-}$ dams had higher SAP than B6 (Figure 2A). Duration of the hypotensive phase was longer in $Pgf^{f/-}$ dams than the single day nadir in B6 (Figure 2B).

Echocardiographic evaluation of cardiac function

Echocardiographic analyses in virgin $Pgf^{f/-}$ and B6 mice showed no functional differences. In pregnant $Pgf^{f/-}$ females, cardiac output (CO) and stroke volume (SV) were stable while in pregnant B6 females CO and SV increased over gestation, as expected for a normal pregnancy (Figures 2C and 2D). CO was reduced overall in $Pgf^{f/-}$ dams across pregnancy compared with B6 ($p=0.008$); significance at specific time-points was found at gd14 and gd16 (Figure 2C). Overall SV during pregnancy was also smaller in $Pgf^{f/-}$ dams compared to B6 ($p=0.005$), reaching a specific time point statistical significance at gd16 (Figure 2D).

Echocardiographic and post-mortem assessment of cardiac structure

There were no statistical differences between $Pgf^{f/-}$ and B6 heart or LV weights for virgin animals (determined by echocardiography) (Figure 3A-C). Echocardiography did not detect any

change in *Pgf*^{-/-} LV mass over pregnancy while LV mass increased from virgin levels over gestation in B6 (Figure 3A).

Post-mortem studies of hearts collected at each study time point supported the echocardiographic data. When normalized to tibia length, *Pgf*^{-/-} LV wet-weight did not change over gestation while B6 LV wet-weight increased from its virgin level over gestation (Figure 3B). Overall differences in normalized LV mass throughout pregnancy and post-partum between *Pgf*^{-/-} and B6 mice were not significant (p=0.088; Figure 2B). Normalized total heart weight increased over gestation and post-partum only in B6 (Figure 3C). Lack of PGF had an effect on total heart weight with *Pgf*^{-/-} hearts being heavier than B6 over virgin, pregnancy and post-partum time-points (p=0.049); analysis of individual pregnancy time-points did not show statistical differences between genotypes (p=0.089) (Figure 3C).

Virgin *Pgf*^{-/-} and virgin B6 LVs appeared structurally similar by routine histological examination (Supplemental Figure S3). Morphometric studies looking at wall width and chamber size at gd16 (when cardiac functional differences were seen sonographically) suggested that *Pgf*^{-/-} LVs were not different from B6 (p=0.16; data not shown).

LV gene and protein expression

RT qPCR analysis for LV relative expression of the natriuretic peptide and VEGF gene systems (*Nppa*, *Nppb*, *Npra*, *Nprc*, *Vegfa*, *Vegfb*, *Vegfr1*, *Vegfr2*) found no differences between *Pgf*^{-/-} versus B6 in virgin, gd8 or gd14 animals (data not shown). Relative *Eng* expression across all samples was greater in *Pgf*^{-/-} LV versus B6 across gestation but did not reach significance at any specific time point studied (Figure 4A). Genotype had an effect on overall *Nos3* relative expression, with greater expression in *Pgf*^{-/-} LV. Time-point specific differences in *Nos3* were present in gd8 but not virgin or gd14 *Pgf*^{-/-} versus B6 LV (Figure 4B). PGF deficiency had a similar gestation day specific effect on relative *Nos2* expression, being higher only in gd8 *Pgf*^{-/-} LV. The effect of genotype on overall relative *Nos3* expression showed a statistically non-significant increase in *Pgf*^{-/-} LV (p=0.09; Figure 4C). These dynamic expression patterns were confirmed using IHC (Figure 4D-G).

*Renal analyses in virgin and pregnant *Pgf*^{-/-} mice*

Renal artery RI, used to measure downstream vascular impedance, did not differ between virgin *Pgf*^{-/-} versus B6. Gestational renal artery RI in *Pgf*^{-/-} was also not statistically different versus B6 (p=0.11; Figure 5A). Postmortem kidney weights normalized to tibia lengths were greater in *Pgf*^{-/-} than in pregnancy status-matched B6 (p=0.036; Figure 5B). Renal histopathology (Figure 5C) at gd16 quantified glomerular hypercellularity and depleted urinary spaces in *Pgf*^{-/-} versus B6 kidneys (p<0.001; Figure 5D-5E).

*Fetal outcomes in *Pgf*^{-/-} pregnancy*

Uterine artery RI was elevated in *Pgf*^{-/-} versus B6 dams across gestation (Figure 6A) but not at any specific gd. Fetal heart rates however did not differ between genotypes (Figure 6B). Umbilical artery RI was also similar between genotypes (Figure 6C) as were intrapartum and postpartum litter sizes (Figure 6D). *Pgf*^{-/-} fetuses weighed less than B6 fetuses at both gd14 and gd18. This difference did not persist postpartum with pup weights measured as equivalent at PP day 4 (Table 1). These differences between groups in fetal and postnatal offspring weights were not associated with differences between genotypes in maternal body weight across pregnancy (Supplemental Table S2).

DISCUSSION

This study provides the first thorough physiological assessment of the effect of PGF deficiency on mouse pregnancy. We postulated that the high PGF concentrations that develop in the plasma of pregnant women between early pregnancy and week 30 may contribute to the maternal CV adaptations necessary for support of conceptus growth and pregnancy success. Our comparisons between *Pgf*^{-/-} and B6 pregnancies document an involvement of PGF in the normal cardiac adaptations that occur during mid to late pregnancy [20]. We found that by gd8 PGF concentrations in B6 maternal plasma were elevated over preconception values. Peak levels were found over gd10-14, after which PGF levels dropped and had returned to baseline at PP day 30. This pattern reflects the *Pgf*^{-/-} gene expression time-course measured previously in decidua basalis [9] and is generally similar to that seen in human pregnancy. The pattern of mouse PGF fluctuation was coordinated with various maternal cardiac changes measured over normal B6 pregnancy. Cardiac functional parameters, such as CO and SV, peaked during mid-gestation (gd10-14). Similarly, structural parameters, such as LV mass, reached peak levels during mid-gestation.

In humans, maternal plasma PGF deficiency is linked to the hypertensive disorder preeclampsia (PE) and fetal growth restriction [21-23]. However, neither the effects of PGF on regulation of maternal blood pressure nor the roles of PGF in fetal development and growth are known. We evaluated both features in *Pgf*^{-/-} mice that were confirmed by ELISA and PCR to be PGF deficient. Although radiotelemetric studies are regarded as the optimal approach for blood pressure studies in rodents [24] and were attempted, they could not be conducted in *Pgf*^{-/-} mice due to cerebral vascular anomalies, including an incomplete circle of Willis in >80% of adult *Pgf*^{-/-} females and males [16]. We therefore used plethysmography to assess the impact of PGF deficiency on gestational blood pressure. The key findings in *Pgf*^{-/-} dams were that preconception SAP was higher, and that the pregnancy-induced drop in SAP (between gd6-9) was extended in length. Once *Pgf*^{-/-} SAP returned to baseline (gd14), it differed from B6 by being unstable and dropping between gd16 and term. These measurements suggest an association of PGF with fine control of gestational blood pressure and with the normal, mid-gestational rebound in MAP [17, 25]. The normal mid-gestational ascent of MAP from nadir in normal mice occurs at the same time as completion of placental development, opening of the placental circulation and intraluminal invasion of trophoblasts [17, 26]. Differences in SAP were also present between gd0-5, with *Pgf*^{-/-} dams having higher SAP than B6. A similar finding that PGF levels inversely correlate with maternal blood pressure was reported in a prospective study of 110 women in 1st trimester [27]. Both the mouse and human data attribute significance to the small elevations in plasma PGF that occur very early in pregnancy. SAP was elevated in *Pgf*^{-/-} dams versus controls in late pregnancy (gd15-18). This phase immediately follows normal peak PGF levels in pregnancies. We postulate that differences in cardiac function between groups at gd14 and gd16, has systemic consequences that are reflected as changes in blood pressure by phase 4 of pregnancy. Baseline/pre-pregnancy SAP appeared higher in *Pgf*^{-/-} females but did not reach statistical significance.

An important component of blood pressure regulation is the kidney. Both PGF and VEGF are linked to renal development and function and glomerular podocytes are known to express PGF [28]. Renal hypertrophy, glomerular hypercellularity and diminished urinary space were seen in *Pgf*^{-/-} compared to B6 kidneys in late pregnancy. The elevated systolic pressures during

early and late *Pgf*^{-/-} pregnancy could either contribute to or result from the renal hypertrophy observed in pregnant *Pgf*^{-/-} females.

Prior to conception, *Pgf*^{-/-} hearts did not differ statistically from B6 hearts in any parameter measured. This supports previously published data that *Pgf*^{-/-} mice, prior to any intervention, have no cardiac phenotype [29]. Increases in CO and SV characterize normal pregnancy in mice and women [30, 31]. These pregnancy-induced CV stressors bear similarities to other CV stressors, such as pressure overload or myocardial infarct [2, 3, 29, 32, 33]. In these latter conditions, PGF administration decreases heart failure incidence and ameliorates recovery by increasing cardiac angiogenesis and promoting adaptive hypertrophy. Gd16 *Pgf*^{-/-} hearts phenotypically resembled pressure overload-hearts, being enlarged by weight but having a similar ventricular wall thickness than controls [2, 3, 29, 32-35]. The most pronounced cardiac differences between pregnant *Pgf*^{-/-} and B6 dams were in CO and SV at gd14 and gd16, days following the highest circulating concentrations of PGF in normal pregnant mice. We suggest this reflects a delay in adaptation to PGF deficiency and indicates a role for PGF in maternal cardiac remodeling over mid pregnancy. Normalization of these parameters by gd18 in *Pgf*^{-/-} dams corresponds with the decrease in circulating PGF levels of normal pregnancy and suggests a limited window for PGF activity during gestational CV adaptations. Dilatory growth is a possible explanation for the failure of CO and SV to increase across *Pgf*^{-/-} gestations.

Cardiac stress alters expression levels of many genes [36, 37]. Members of the NOS gene system are prominent amongst the genes altered during cardiac stress and, like PGF, participate in cardioprotection, the hypertrophic response and angiogenesis [34, 36, 38, 39]. In mice, overexpression of *Pgf* increases LV *Nos3* expression and NO production, steps pivotal to downstream cardiomyocyte hypertrophy [34]. Upregulation of *Nos3* by pregnancy in *Pgf*^{-/-} LV must be mediated via another, as yet undefined pathway. Both PGF and NOS3 increase adaptive hypertrophy in a cardioprotective manner; however, NOS3 (through NO) also has strong vasodilatory properties. This may contribute to the development of a more dilatory hypertrophy in the hearts of late gestational *Pgf*^{-/-} dams. Much like NOS3, NOS2 has cardioprotective effects [40] and increased NOS2 levels are a downstream, compensatory effect of the increased systolic pressure in *Pgf*^{-/-} early pregnancy [41]. Exaggerated fluctuations in blood pressure across pregnancy in *Pgf*^{-/-} dams and their diminished ability to quickly rebound from the mid-gestation nadir may contribute to altered *Nos2* expression. *Nos2* and *Nos3* expression in the heart appear to be inversely correlated with blood pressure in *Pgf*^{-/-} dams at mid-gestation. The extended nadir in systolic pressure in *Pgf*^{-/-} dams may result from the vasodilatory outcomes from increased *Nos* expression [42], however, this is yet to be addressed experimentally.

PGF deficiency and its associated maternal CV alterations were of limited impact on fetal blood flow and growth. Increased uterine artery RI in *Pgf*^{-/-} dams indicated an increase in downstream vascular impedance [43]. PGF is known to contribute to uterine artery vasodilation, and these effects are pronounced in pregnancy [14]; in this way PGF contributes to uterine artery remodeling in response to pregnancy [44]. Spiral artery modification is only slightly delayed in pregnant *Pgf*^{-/-} versus B6 females [9], suggesting that spiral arteries are not the cause of the impedance we observed. Intrapartum death was not elevated in *Pgf*^{-/-} litters and fetuses had normal heart rates and umbilical flow velocities. However, late gestational *Pgf*^{-/-} fetuses were lighter than controls, suggesting that PGF-driven angiogenesis may contribute directly to fetal growth rates, rather than through measurable circulatory parameters. Normalization of offspring

weight by postnatal day 4 suggests acquisition of an additional CV risk factor, as rapid postnatal growth after slower than normal fetal growth is associated with subsequent CV and metabolic diseases [45-47]. Thus, while PGF appears redundant for fetal development, the high levels of PGF found in maternal plasma during normal pregnancy are associated with protective functions on the maternal CV system across mid gestation. The late pregnancy decline in maternal plasma PGF may reflect completion of the major steps of maternal cardiac and vascular remodeling needed to support the latest stages of pregnancy.

This study reveals novel associations between PGF levels and normal maternal CV adaptations to pregnancy. Continued efforts to stratify pregnant women who go on to develop pregnancy complications into those with low or with normal levels of PGF are warranted. This will enable refined evaluations of the exact role of PGF in the disturbed CV adaptations seen in pregnancy complications. Further evaluations may also shed light on the role of PGF in subsequent maternal CV risk after a complicated pregnancy [48].

Declaration of Interest:

Peter Carmeliet holds patents on the use PGF as a cardioprotectant.

Acknowledgements:

The authors thank Ms. Tiziana Cotechini and Ms. Wilma Hopman for technical support and assistance in statistical analysis. We thank Ms. Carolina Venditti for instruction in plethysmography, Dr. Alastair Ferguson for provision equipment and Dr. David Armstrong for qPCR primer design. We appreciated the advice given by Dr. Iain Young on renal histological data. We also thank Mr. Matthew Rätsep, Ms. Ashley Martin, Ms. Vanessa Kay and Dr. Patricia Lima for technical assistance.

REFERENCES

1. Vrachnis N, Kalampokas E, Sifakis S, Vitoratos N, Kalampokas T, Botsis D, Iliodromiti Z. Placental growth factor (PlGF): a key to optimizing fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; 26:995-1002.
2. Iwasaki H, Kawamoto A, Tjwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Matsumoto T, Suehiro S, Carmeliet P, Asahara T. PlGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. *PLoS One* 2011; 6:e24872.
3. Carnevale D, Lembo G. Placental growth factor and cardiac inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2012; 22:209-212.
4. Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 979:80-93.
5. Craici I, Wagner S, Garovic VD. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2:249-259.
6. Hunter S, Robson SC. Adaptation of the maternal heart in pregnancy. *Br Heart J* 1992; 68:540-543.
7. Tsiaras S, Poppas A. Cardiac disease in pregnancy: value of echocardiography. *Curr Cardiol Rep* 2010; 12:250-256.
8. Harris LK, Aplin JD. Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy. *Reprod Sci* 2007; 14:28-34.

9. Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, Foster RA, Croy BA. Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. *J Immunol* 2007; 178:4267-4275.
10. Ratsep MT, Carmeliet P, Adams MA, Croy BA. Impact of placental growth factor deficiency on early mouse implant site angiogenesis. *Placenta* 2014.
11. Welch PC, Amankwah KS, Miller P, McAsey ME, Torry DS. Correlations of placental perfusion and PIGF protein expression in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:1625-1629; discussion 1629-1631.
12. De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med* 2012; 44:1-9.
13. Verlohren S, Stepan H, Dechend R. Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 2012; 122:43-52.
14. Dewerchin M, Carmeliet P. PIGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2.
15. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compornolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7:575-583.
16. Ratsep MT, Felker AM, Kay VR, Tolusso L, Hofmann AP, Croy BA. Uterine natural killer cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction* 2014.
17. Burke SD, Barrette VF, Bianco J, Thorne JG, Yamada AT, Pang SC, Adams MA, Croy BA. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. *Hypertension* 2010; 55:729-737.
18. Armstrong DW, Tse MY, Wong PG, Ventura NM, Meens JA, Johri AM, Matangi MF, Pang SC. Gestational hypertension and the developmental origins of cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction. *Mol Cell Biochem* 2014; 391:201-209.
19. Wong PG, Armstrong DW, Tse MY, Brander EP, Pang SC. Sex-specific differences in natriuretic peptide and nitric oxide synthase expression in ANP gene-disrupted mice. *Mol Cell Biochem* 2013; 374:125-135.
20. Melchiorre K, Sharma R, Thilaganathan B. Cardiac structure and function in normal pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2012; 24:413-421.
21. Powers RW, Roberts JM, Plymire DA, Pucci D, Datwyler SA, Laird DM, Sogin DC, Jeyabalan A, Hubel CA, Gandley RE. Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia? *Hypertension* 2012; 60:239-246.
22. Alahakoon TI, Zhang W, Trudinger BJ, Lee VW. Discordant clinical presentations of preeclampsia and intrauterine fetal growth restriction with similar pro- and anti-angiogenic profiles. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014.
23. Molvarec A, Gullai N, Stenczer B, Fugedi G, Nagy B, Rigo J, Jr. Comparison of placental growth factor and fetal flow Doppler ultrasonography to identify fetal adverse outcomes in women with hypertensive disorders of pregnancy: an observational study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13:161.
24. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davisson RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional

and public education of the American Heart Association council on high blood pressure research. *Hypertension* 2005; 45:299-310.

25. Tejera E, Areias MJ, Rodrigues AI, Nieto-Villar JM, Rebelo I. Blood pressure and heart rate variability complexity analysis in pregnant women with hypertension. *Hypertens Pregnancy* 2012; 31:91-106.

26. Hofmann AP, Gerber SA, Croy BA. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. *Mol Hum Reprod* 2014; 20:66-76.

27. Kasdaglis T, Aberdeen G, Turan O, Kopelman J, Atlas R, Jenkins C, Blitzer M, Harman C, Baschat AA. Placental growth factor in the first trimester: relationship with maternal factors and placental Doppler studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35:280-285.

28. Tjwa M, Luttmun A, Autiero M, Carmeliet P. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res* 2003; 314:5-14.

29. Accornero F, van Berlo JH, Benard MJ, Lorenz JN, Carmeliet P, Molkentin JD. Placental growth factor regulates cardiac adaptation and hypertrophy through a paracrine mechanism. *Circ Res* 2011; 109:272-280.

30. Kulandavelu S, Qu D, Adamson SL. Cardiovascular function in mice during normal pregnancy and in the absence of endothelial NO synthase. *Hypertension* 2006; 47:1175-1182.

31. Savu O, Jurcut R, Giusca S, van Mieghem T, Gussi I, Popescu BA, Ginghina C, Rademakers F, Deprest J, Voigt JU. Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012; 5:289-297.

32. Iwama H, Uemura S, Naya N, Imagawa K, Takemoto Y, Asai O, Onoue K, Okayama S, Somekawa S, Kida Y, Takeda Y, Nakatani K, et al. Cardiac expression of placental growth factor predicts the improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1559-1567.

33. Gmeiner M, Zimpfer D, Holfeld J, Seebacher G, Abraham D, Grimm M, Aharinejad S. Improvement of cardiac function in the failing rat heart after transfer of skeletal myoblasts engineered to overexpress placental growth factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141:1238-1245.

34. Jaba IM, Zhuang ZW, Li N, Jiang Y, Martin KA, Sinusas AJ, Papademetris X, Simons M, Sessa WC, Young LH, Tirziu D. NO triggers RGS4 degradation to coordinate angiogenesis and cardiomyocyte growth. *J Clin Invest* 2013; 123:1718-1731.

35. Gigante B, Morlino G, Gentile MT, Persico MG, De Falco S. Plgf^{-/-}eNos^{-/-} mice show defective angiogenesis associated with increased oxidative stress in response to tissue ischemia. *FASEB J* 2006; 20:970-972.

36. Romero M, Caniffi C, Bouchet G, Elesgaray R, Laughlin MM, Tomat A, Arranz C, Costa MA. Sex differences in the beneficial cardiac effects of chronic treatment with atrial natriuretic Peptide in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 2013; 8:e71992.

37. Wong J, Chang C, Agrawal R, Walton GB, Chen C, Murthy A, Patterson AJ. Gene expression profiling: classification of mice with left ventricle systolic dysfunction using microarray analysis. *Crit Care Med* 2010; 38:25-31.

38. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, van Haperen R, de Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H276-282.

39. Manoury B, Montiel V, Balligand JL. Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc Res* 2012; 94:304-315.

40. Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11507-11512.
41. Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11:1913-1928.
42. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
43. Ogueh O, Clough A, Hancock M, Johnson MR. A longitudinal study of the control of renal and uterine hemodynamic changes of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2011; 30:243-259.
44. Osol G, Celia G, Gokina N, Barron C, Chien E, Mandala M, Luksha L, Kublickiene K. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1381-1387.
45. Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, Aiken CE, Ozanne SE. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J* 2013; 27:379-390.
46. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Deanfield J, Lucas A. Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation* 2004; 109:1108-1113.
47. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 1999; 318:427-431.
48. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013; 122:1122-1131.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Circulating PGF concentrations in B6 mice using ELISA (n=3-5 pregnancies/time-point). PGF was below detectable levels in all *Pgf^{-/-}* dams (not shown). PGF concentrations in B6 females peaked at gd10, the only time-point that showed a significant difference from virgin levels. Gd10 levels were not significantly higher than levels at gd14; but were higher than all other time points measured. Significance determined by one-way ANOVA with Tukey's post-test. *p≤0.05 from gd10, **p≤0.001 from gd10.

Figure 2. Systolic arterial pressure (SAP; **A-B**) was analyzed in trained *Pgf^{-/-}* and control females across gestation using tail cuff plethysmography (n=4 B6, n=3 *Pgf^{-/-}*). **A**) Raw SAP over pregnancy was segregated into phases according to typical blood pressure fluctuations in normal mouse pregnancy (29). In phases 1 (gd0-5) and phase 4 (gd15-18), SAP was higher in *Pgf^{-/-}* than B6 dams. Baseline (pre-pregnancy) values are indicated for *Pgf^{-/-}* (horizontal dotted line) and B6 (horizontal solid line). Pre-pregnancy SAP was higher in *Pgf^{-/-}* versus control females. **B**) SAP was normalized to baseline values and represented as a change from baseline over pregnancy. Fluctuations in SAP in *Pgf^{-/-}* dams appear to follow the same trends as B6 dams, however, magnitude of fluctuations appear more pronounced. The nadir appearing at gd9 in control mice appears to be prolonged to several days in *Pgf^{-/-}* (**A-B**). PGF-related functional adaptations of the maternal heart. Maternal cardiac systolic function (**B-C**) was assessed using echocardiography (n=3-5/group/time-point). **C**) Cardiac output (CO) increases over gestation in B6 dams but not *Pgf^{-/-}* dams (by linear regression). PGF has an affect on CO in pregnancy, with decreased CO seen in *Pgf^{-/-}* females, reaching significance at gd14 and gd16. **D**) Stroke volume (SV) increases

across gestation only in B6 dams (by linear regression). SV is lower overall in *Pgf*^{-/-} females; differences at specific gds were reached at gd16. Changes over time were determined by linear regression with a statistically non-zero slope (C-D). Differences between groups were determined by Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (A-D). *P≤0.05, **P≤0.01, ***P≤0.001 versus age-matched B6.

Figure 3. PGF deficiency is accompanied by cardiac structural differences across pregnancy and post-partum. **A)** Left ventricular (LV) mass, determined by echocardiography (n=3-5/group/time-point), increased over gestation in B6 but not *Pgf*^{-/-} dams. Total heart wet weight and chamber weights were determined at euthanasia (n=3-5/group/time-point; **B-C**). Weights were normalized to tibia length (unchanged between groups; p=0.17) to account for differences in body weight initially and over the course of pregnancy (**B-C**). **B)** Normalized LV mass appeared increased in *Pgf*^{-/-} dams compared to controls across pregnancy and post-partum, the difference was not significant (p=0.088). **C)** Normalized heart mass was greater in *Pgf*^{-/-} versus B6 dams throughout pregnancy and post-partum (p=0.049) but the differences did not reach significance at any specific time-point. Changes over time were determined by linear regression with a statistically non-zero slope (**A**). Differences between groups were determined by Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (**B-C**).

Figure 4. Upregulated gene expression in left ventricular (LV) tissue of *Pgf*^{-/-} mice at midgestation. mRNA expression was determined using qPCR and normalized to expression of *Gapdh* (n=4/group/time-point; **A-C**). Differences in LV NOS2 and NOS3 protein levels were measured by IHC (**D-G**). **A)** Relative endoglin (*Eng*) expression was increased overall compared to B6 controls (p=0.039) but did not reach significance at any specific time-point. **B)** Relative *Nos3* (*eNOS*) expression was increased in *Pgf*^{-/-} LV compared to B6. Differences at specific time points were significant at gd8. **C)** Relative LV *Nos2* (*iNOS*) expression was increased in *Pgf*^{-/-} compared to B6 only at gd8. **D)** NOS3 protein expression showed a non-statistically significant increase in *Pgf*^{-/-} LV compared to B6 overall (p=0.09); gestation-day specific differences reached significance at gd8 (p<0.01). **E)** NOS2 protein expression was also increased in *Pgf*^{-/-} LV tissue versus B6 control both overall (p<0.0001) and at gd8 (p<0.001). **F-G)** Representative micrographs from virgin, gd8 and gd14 *Pgf*^{-/-} and B6 LV showing IHC staining for NOS3 and NOS2 with hematoxylin counter-stain. Quantitative differences in IHC staining were determined by relative pixel density. Inlets represent negative isotype control (**F-G**). Differences between groups determined by Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (**A-C**). *P≤0.05. **P≤0.01, ***P<0.001. Bars = 20µm.

Figure 5. Renal hypertrophy and structural abnormalities are present in pregnancies lacking PGF. **A)** Renal artery RI in *Pgf*^{-/-} versus B6 did not reach a statistically significant difference (n=3-5/group/time-point, p=0.11). **B)** Total kidney wet-weight was measured at euthanasia and normalized to tibia length (n=3-5/group/time-point). Kidney weight increased in *Pgf*^{-/-} dams over pregnancy and post-partum compared to B6 controls (p=0.0015). Differences at specific gd reached significance by 30 days post-partum (pp30). **C)** Representative sections from non-pregnant (NP) and gd16 *Pgf*^{-/-} and B6 dams. **D)** Bowman's capsular space (urinary space) was measured in randomly selected cortical glomeruli by subtracting glomerular area from total corpuscle surface area (n=3/group/time-point). Urinary space was significantly decreased in *Pgf*^{-/-} kidneys versus controls. **E)** Cellularity was measured in 10 random glomeruli; cellularity

was increased in gd16 *Pgf*^{-/-} versus B6 kidneys. Bars=20 μ m (C). Differences between groups were determined by Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (A-B). Differences in urinary space and glomerular cellularity at gd16 were determined by Student's T-Test (D-E).

*** $P \leq 0.0001$.

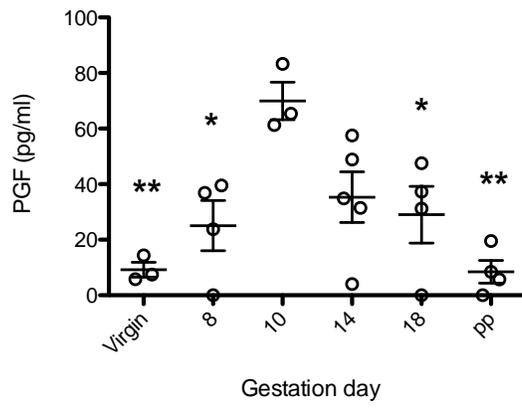
Figure 6. Maternal CV consequences of PGF deficiency have negligible fetal impact. High-frequency ultrasound was used for velocimetry of the uterine and umbilical arteries (n=3-5 dams/group/time-point; n=4 fetuses/dam) (A-C). **A)** Uterine RI is increased in *Pgf*^{-/-} dams compared to B6 across gestation (p=0.013) but did not reach significance at any specific gd. **B)** Fetal heart rate was measured between peaks on PW Doppler cine loops of the umbilical artery. Fetal heart rate did not differ between genotypes at any gestational time-point measured. BPM= Beats per minute. **C)** Umbilical artery RI did not differ between genotypes across gestation. **D)** Litter size did not differ between *Pgf*^{-/-} and B6 pregnancies. Differences between groups were assessed by Two-way ANOVA with Bonferroni's post-test (A-D).

TABLE 1. Fetal/pup weight in gestation and postpartum.^a

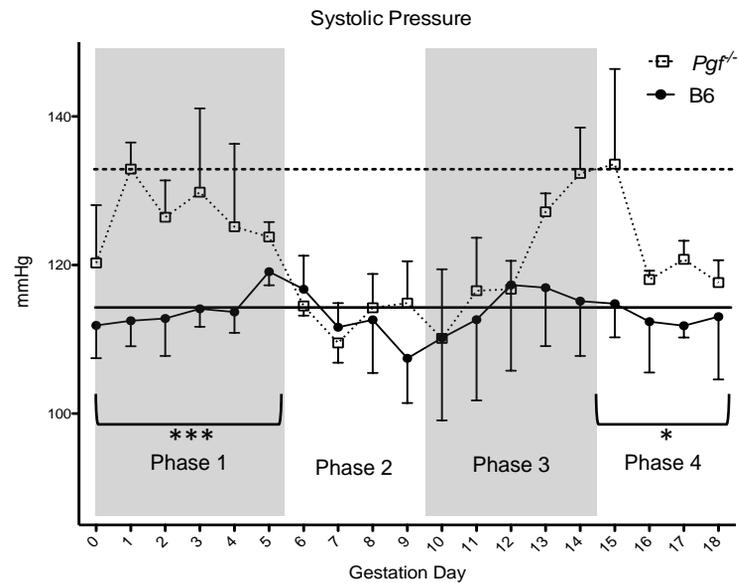
Group	<i>Pgf</i> ^{-/-} fetal/pup weight (g)	<i>Pgf</i> ^{-/-} (n)	B6 fetal/pup weight (g)	B6 (n)	<i>P</i> value
gd14	0.206±0.006	16	0.27±0.004	16	<0.0001
gd18	0.976±0.034	12	1.217±0.049	12	0.0005
PND4 ^b	3.095±0.196	22	3.324±0.146	19	0.37

^an = 3–4 dams per group^bPND4, Postnatal Day 4.

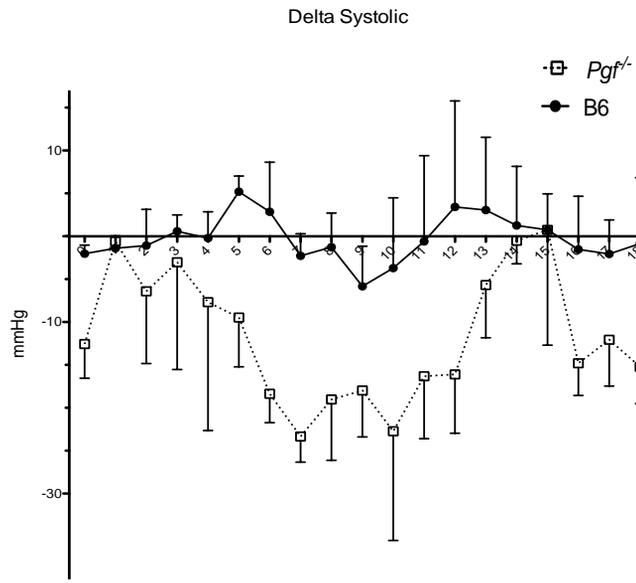
Figure 1



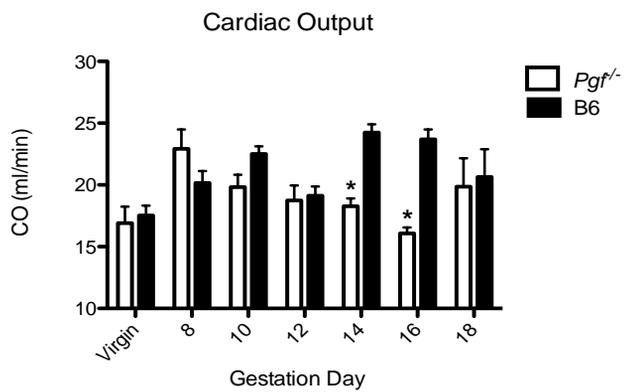
A.



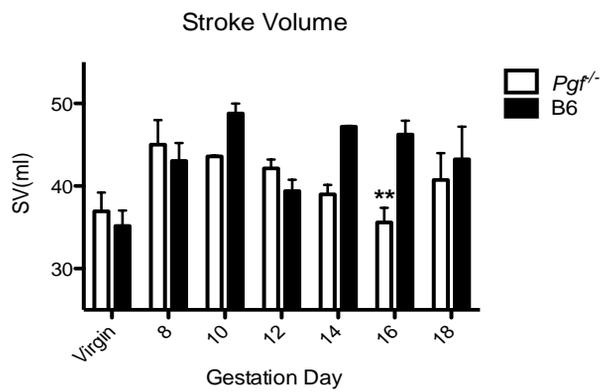
B.

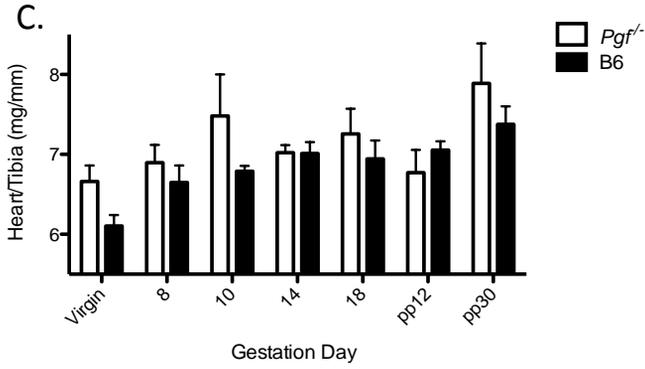
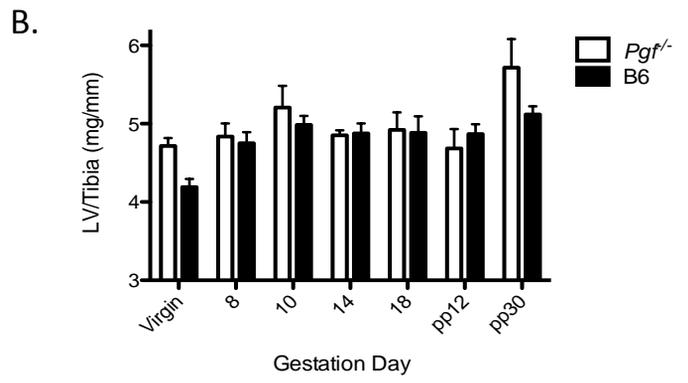
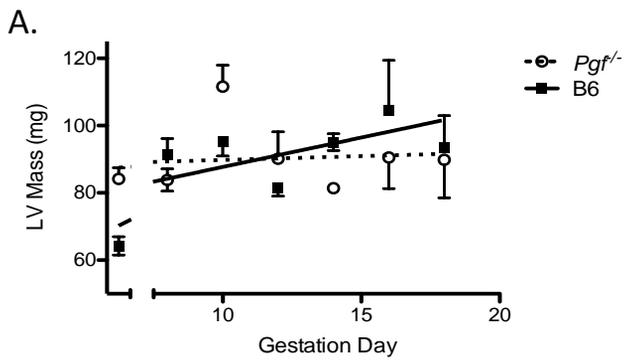


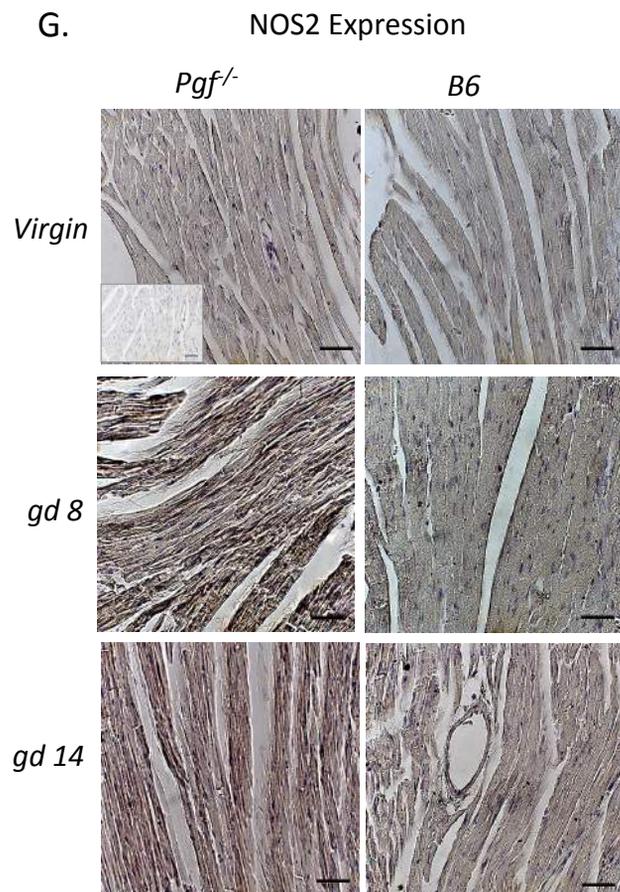
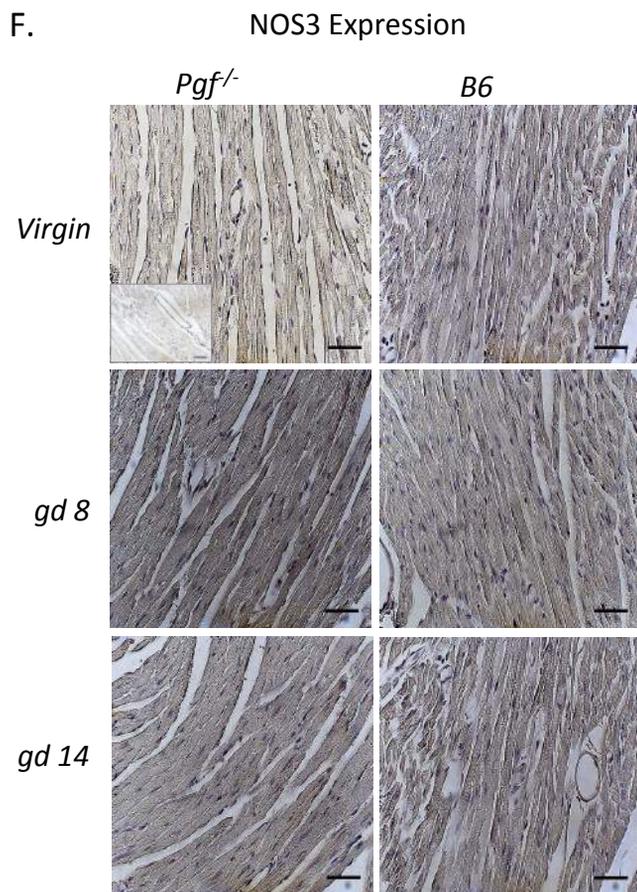
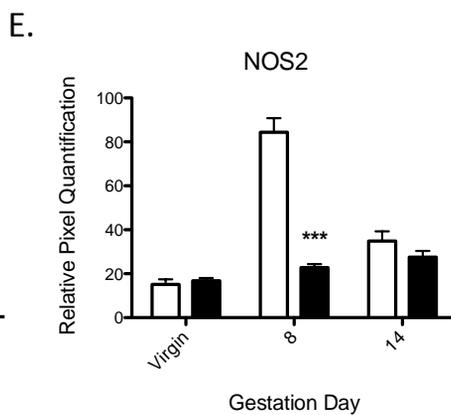
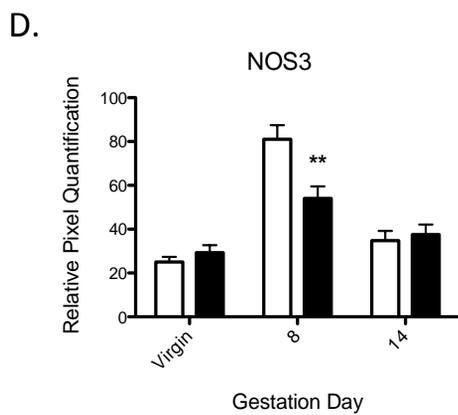
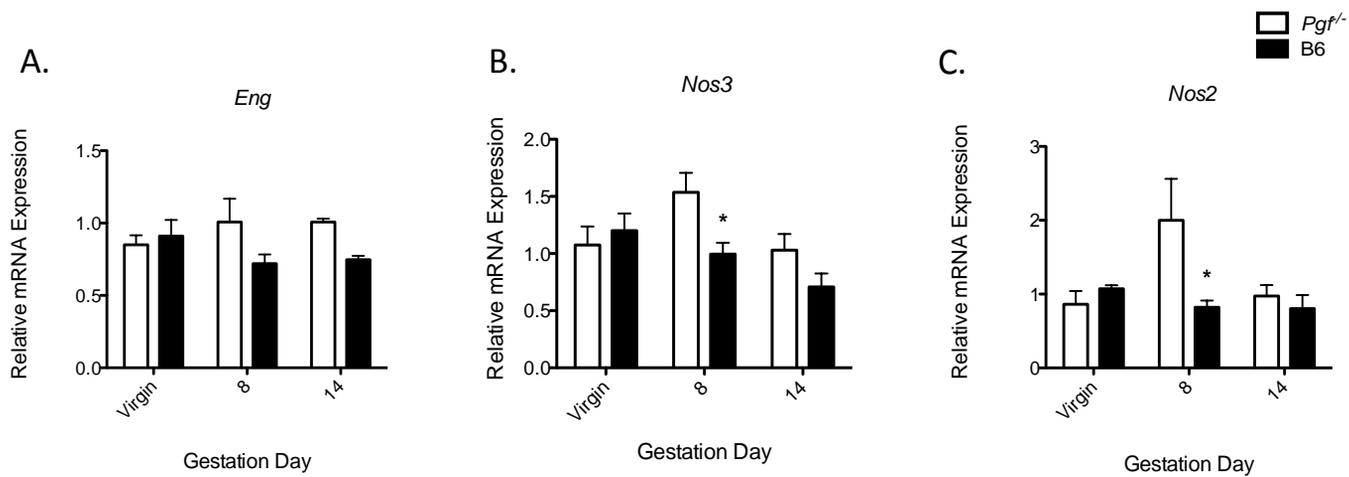
C.

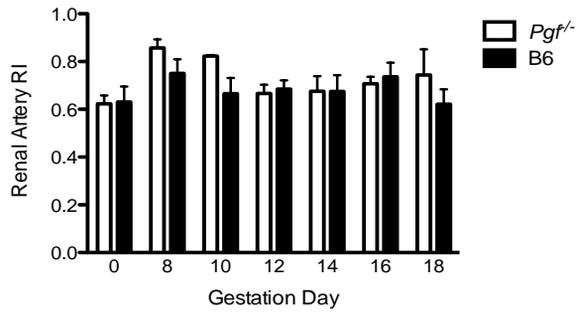
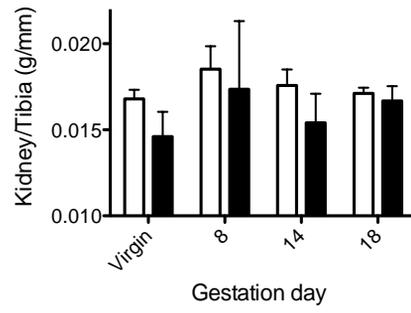
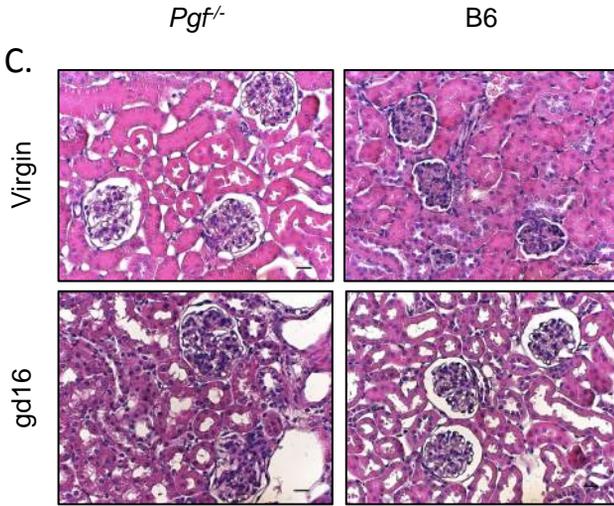
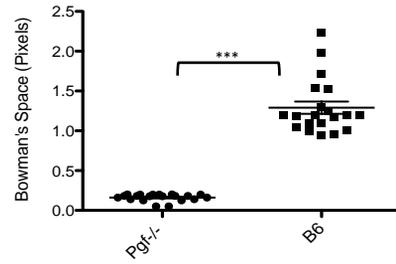
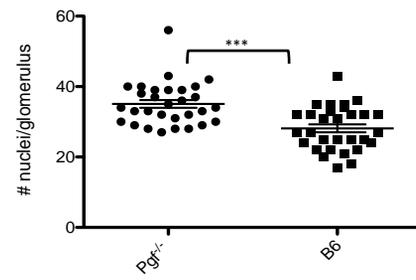


D.

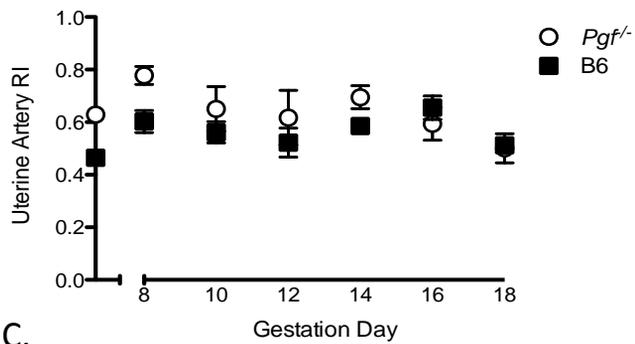




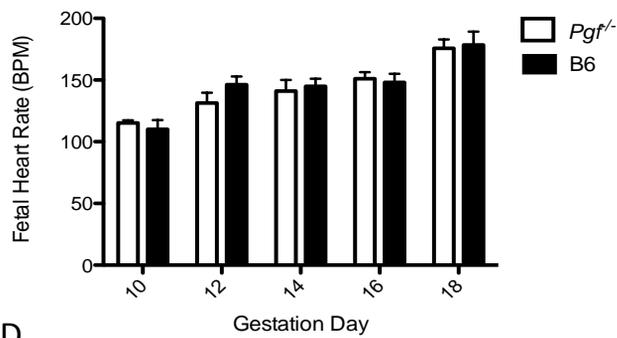


A.**B.****C.****D.****E.**

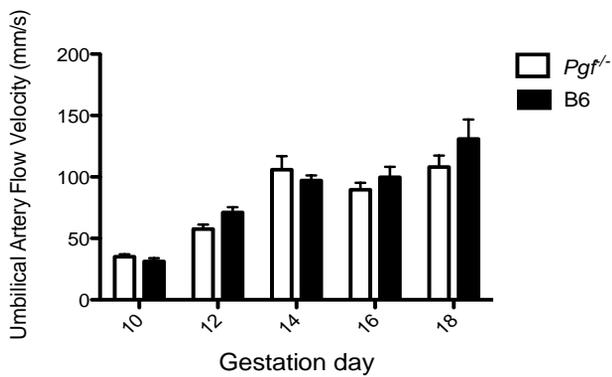
A.



B.



C.



D.

