



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas/MG.
CEP 37130-000



Renato de Oliveira Horvath

***Responsividade das Células Natural Killer Uterinas
DBA⁺ e alterações comportamentais frente ao
Tratamento com Ciclofosfamida***

Alfenas/MG

2015

Renato de Oliveira Horvath

***Responsividade das Células Natural Killer Uterinas
DBA⁺ e alterações comportamentais frente ao
Tratamento com Ciclofosfamida***

Dissertação elaborada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais (UNIFAL- MG).
Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Horvath, Renato de Oliveira.

Responsividade das células Natural Killer uterinas DBA+ e alterações comportamentais frente ao tratamento com ciclofosfamida \ Renato de Oliveira Horvath. -- Alfenas/MG, 2015. 124 f.

Orientador: Valdemar Antonio Paffaro Junior

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Gravidez. 2. Desenvolvimento Embrionário e Fetal / efeitos de drogas. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio. II. Título.

CDD-571.86

Renato de Oliveira Horvath

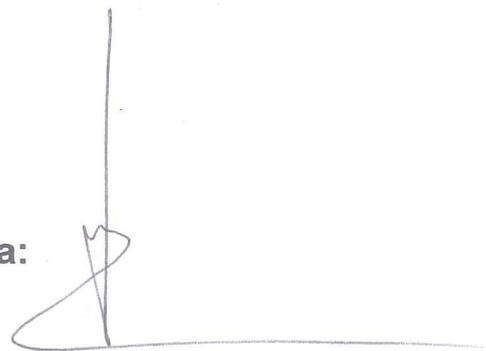
***Responsividade das Células Natural Killer Uterinas
DBA⁺ e alterações comportamentais frente ao
Tratamento com Ciclofosfamida***

Dissertação elaborada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais (UNIFAL- MG).
Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior.

Aprovada em: 29/07/2015

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior
Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Prof(a). Dra. Mara Sandra Hoshida
Instituição: USP-SP

Assinatura:

Mara Sandra Hoshida

Prof(a). Dra. Marisa Ionta
Instituição: Unifal-MG

Assinatura:



Dedico às minhas mães, Maria Guiomar e Maria Sinira, pelo apoio, amor e afeto, à minha Camila, pelo amor e companheirismo, ao meu irmão pelo entusiasmo e à minha avó, Salomé, por olhar por mim do céu...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pela saúde, pelo infinito amor e por fazer de mim um instrumento da ciência;

Agradeço a minha mãe, Maria Guiomar, pela paciência, por ser meu porto seguro, por caminhar ao meu lado independentemente do que aconteça, por ser exemplo de mulher forte, guerreira e pelo infinito amor;

Agradeço a minha madrinha e segunda mãe, Maria Sinira, por ser um exemplo de profissional, pela educação, pelos puxões de orelha, pelo amor e por fazer possível que hoje eu concluísse meu mestrado;

À minha namorada, Camila Maria, pelo amor, companheirismo, carinho e aconchego;

Ao meu irmão, Luiz Carlos, e à minha cunhada, Rosana Tavares, pelo companheirismo, amizade e entusiasmo;

À minha avó, Salomé, por estar do meu lado em todos os momentos da minha vida, por me ensinar que o amor de Deus é maior que todas as coisas e por ser uma fonte inesgotável amor, carinho e serenidade;

Ao meu orientador, Professor Doutor Valdemar Antônio Paffaro Júnior, pela dedicação, ensinamentos, amizade, companheirismo e, acima de tudo, por ser um exemplo de honestidade, caráter e amor à profissão;

À minha professora, Professora Doutora Andréa Mollica do Amarante Paffaro, por tudo que me ensinou e pelo exemplo de amor à profissão;

Aos meus amigos de laboratório, Wesley, Évila e Bruno Zavan que, além da amizade e convivência, são exemplos de competência, dedicação ao trabalho e sucesso.

Aos meus amigos de laboratório, Letícia, Carol Chaves, Paulo, Simone, Rodrigo, Guilherme, Leilane, Pablo, Glícia, João Gabriel, Camila Pernambuco, Fernando Felicione, Rafael, Délcio, Márcio e aos técnicos e funcionários do

laboratório, Paulo Alvarenga, Fernando Ponciano, Andréa, Isabel e Neuza, pelo companheirismo e amizade;

À Universidade Federal de Alfenas, pelo suporte;

Ao programa de pós-graduação em Biociências aplicadas à Saúde, pela qualidade e pelo zelo à educação e formação de novos mestres;

À CAPES, pelo auxílio financeiro;

Às professoras Dra. Marisa Ionta e Dra. Jaqueline Carvalho, por despertar em mim o amor à biologia do câncer;

Ao Professor Alexandre Giusti-Paiva, pela sabedoria, competência e pelos exemplos;

Aos demais professores do programa, Dr. Alex Rafacho, Dr. Luciano Bruno de Carvalho, Dr. Wagner Rossi e Dra. Alessandra Esteves, pelos conhecimentos;

E por todos aqueles que, apesar de não mencionados, foram importantes na minha trajetória.

RESUMO

Durante a gestação, observamos um influxo de linfócitos para a região mesometrial de camundongos denominados de células Natural Killer Uterinas (uNK). Estas células desempenham funções importantes no início da gestação, como a manutenção da tolerância materna ao feto, angiogênese e remodelação das artérias espiraladas. Sua capacidade citolítica é reduzida podendo ser ativada caso haja algum desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias durante a gestação. A ciclofosfamida é um medicamento usado no tratamento de doenças autoimunes e câncer. Trata-se de um teratógeno, sendo que seu uso pode levar a alterações macroscópicas e microscópicas, bem como, a redução da viabilidade gestacional em camundongos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ciclofosfamida no útero e nas células uNK de camundongos no 10º ddg, por meio da análise morfológica, citoquímica e estereológica concomitantemente a análise da viabilidade gestacional e no comportamento destes animais nos parâmetros de depressão e ansiedade. Nossos resultados mostraram que a ciclofosfamida provoca rapidamente o aumento de células uNK no útero, bem como, diminuição na expressão de N-acetil-D-galactosamina em seus grânulos e superfície, atingindo primeiramente células uNK menos diferenciadas próximas ao mesométrio, e posteriormente células mais diferenciadas em regiões mais próximas ao embrião. Seu efeito drástico na gestação provocou ainda diminuição no número de células uNK após 48h de sua administração, concomitante ao aparecimento de muitos sítios em reabsorção, diminuindo a viabilidade gestacional, bem como, estabelecimento de comportamento semelhante ao doentio nesses animais, causando 100% de perda embrionária diagnosticada em nosso estudo da prenhez a termo.

Palavras Chave: Gestação; Desenvolvimento Embrionário e Fetal / efeitos de drogas

ABSTRACT

During pregnancy, we observed an influx of lymphocytes into the region of mice mesometrial decidua. These cells are natural killer cells (NK), presenting different behavior and phenotype of circulating NK cells. Uterine Natural Killer Cells (uNK) play important roles in early pregnancy, such as maintaining maternal tolerance to the fetus, angiogenesis and remodeling of the spiral arteries. Their cytolytic capacity is reduced during pregnancy and can be activated if there is an imbalance between pro and anti-inflammatory cytokines. Cyclophosphamide is a drug used in treating autoimmune diseases and cancer. It is known that it is a teratogen, and its use can lead to macroscopic and microscopic changes, as well as the reduction of viability pregnancy in mice. The objective of this study was to evaluate the effects of cyclophosphamide in the uterus and in cells uNK (morphological analysis, cytochemistry and stereological) on the 10th ddg, as well as its effects on behavior related to depression and anxiety. Our results showed that cyclophosphamide rapidly increased uNK cells number in the uterus as well as decreased expression of N-acetyl-D-galactosamine in their granules and surface, early reaching less differentiated uNK cells near the mesometrium, and latter more differentiated uNK cells closer to the embryo. His dramatic effect on pregnancy still caused a decreasing in the number of uNK cells 48 after the drug administration, concomitant with the appearance of many resorption implantation sites, decreasing of gestational viability, as well as, establishment of sickness-like behavior, causing 100% of embryo loss diagnosed in the pregnancy to term.

Keywords: Pregnancy. Embryonic and Fetal development / drug effects.

LISTA DE ABREVIATURAS

µm	- Micrômetro
Ang-2	- Angiopoietina 2
CD	- Cluster de diferenciação
CD62L	- L-selectina
CLL	- Quimiocina (c-c motif)
CSF-1	- Fator estimulador de colônias 1
CTB	- Citotrofoblasto
CXCL	- Quimiocina (c-x-c motif)
CXCR	- Quimiocina (c-cx-c motif)
DBA	- <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
DC	- Células Dendríticas
ddg	- Dias de gestação
DLL-1	- Proteína delta-like 1
dNK	- Natural Killer Decidual
eNK	- Natural Killer Endometrial
ER-B	- Receptor para estrogênio
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
EV	- Endovenoso
G-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	- Fator estimulador de colônicas de granulócitos e macrófagos
gp130	- Glicoproteína 130
HIF	- Fator induzido pela hipóxia
HLA-C	- Antígeno leucocitário humano C
HLA-E	- Antígeno leucocitário humano E
HLA-G	- Antígeno leucocitário humano G
IFN-γ	- Intérferon gama
IL-6Rα	- Receptor α para interleucina 6
ITAM	- Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	- Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
Kg	- Kilogramas
Ki67	- Antígeno identificado por anticorpo monoclonal Ki67

KIR	- Receptor tipo imunoglobulina
Ly49	- Receptor tipo lectina
M-CSF	- Fator estimulador de colônias de macrófagos
Mg	- Miligramas
MHC	- Complexos moleculares de histocompatibilidade
MLAp	- Agregado linfóide mesometrial da gestação
MUC-1	- Mucina MUC-1
NK	- Natural Killer
NKp30	- Receptor Natural de citotoxicidade 30
NKp44	- Receptor Natural de citotoxicidade 44
NKp46	- Receptor Natural de citotoxicidade 46
P450	- Citocromo P450
PAS	- Ácido Periódico de Schiff's
RANTES	- Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
TGF-β	- Fator de crescimento transformante beta
Thy-1	- Antígeno de superfície celular Thy-1
Tie2	- Receptor para angiopoietina 2
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
TNF-β	- Fator de necrose tumoral beta
uNK	- Natural Killer Uterina
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF R2	- Receptor 2 para VEGF
VEGF R3	- Receptor 3 para VEGF

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estudo estereológico em microscopia fotônica	46
Figura 2 -	Teste do labirinto em cruz elevado	49
Figura 3 -	Teste de suspensão pela cauda	50
Figura 4 -	Análise da viabilidade gestacional – grupos 1 hora	51
Figura 5 -	Análise da viabilidade gestacional – grupos 2 horas	53
Figura 6 -	Análise da viabilidade gestacional – grupos 48 horas	55
Figura 7 -	Análise da viabilidade gestacional a termo – grupos 8 ^o ddg	56
Figura 8 -	Análise da viabilidade gestacional a termo – grupos 10 ^o ddg	57
Figura 9 -	Análise morfológica com citoquímica de lectina DBA	59
Figura 10 -	Estudo estereológico – número de uNK total e por regiões	61
Figura 11 -	Estudo estereológico – comparação entre grupos tratados	62
Figura 12 -	Análise estereológica pos subtipos dos grupos 1 hora	64
Figura 13 -	Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 1 hora	65
Figura 14 -	Análise estereológica pos subtipos dos grupos 2 horas	67
Figura 15 -	Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 2 horas	69
Figura 16 -	Análise estereológica por subtipos dos grupos 48 horas	70
Figura 17 -	Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 48 horas	71
Figura 18 -	Fotomicrografia dos núcleos picnóticos de animais tratados com ciclofosfamida	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Células Natural Killer Uterinas.....	14
2.2	Ciclofosfamida.....	28
3	JUSTIFICATIVA.....	37
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	Objetivos Gerais.....	38
4.2	Objetivos Específicos.....	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	Animais.....	39
5.2	Protocolo de Tratamento.....	39
5.2.1	Organização dos Grupos Experimentais.....	39
5.2.2	Administração da ciclofosfamida.....	41
5.3	Análise Comportamental	41
5.3.1	Análise da Ansiedade.....	42
5.3.2	Análise da Depressão	42
5.4	Análise da taxa de viabilidade	43
5.5	Análise morfológica e citoquímica.....	44
5.5.1	Procedimento de embebição em parafina.....	44
5.5.2	Procedimento de citoquímica com lectina DBA (Dolichos Biflorus Aglutinnin).....	45
5.5.3	Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica.....	45
5.6	Análise Estatística.....	46
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Análise Comportamental	48
6.2	Análise da Viabilidade Gestacional.....	51
6.3	Análise Morfológica.....	56
6.4	Estudo Estereológico.....	58
7	DISCUSSÃO.....	73
8	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

Durante décadas pesquisadores tentam desvendar o papel que o sistema imunológico tem na manutenção da gestação e desenvolvimento embrionário. Tendo em vista que o embrião pode ser considerado como um semi-enxerto, uma vez que ele possui metade do material genético de origem paterna, várias células do sistema imunológico e mediadores imunológicos atuam em equilíbrio, permitindo que o embrião possa se desenvolver livre do ataque imunológico materno e que a gestação transcorra sem anormalidades.

No estabelecimento da gestação, com o advento da implantação do blastocisto, ocorre um intenso influxo de células uNK (Natural Killer Uterinas), sendo essa população a maior na decídua, que vem mostrando significativa importância na manutenção da homeostase uterina. Além de regular a invasão do trofoblasto, ela secreta fatores angiogênicos que atuam na remodelação das artérias espiraladas e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos que acarreta num aumento do fluxo sanguíneo, suportando assim o desenvolvimento embrionário.

A ciclofosfamida, droga imunossupressora, é amplamente utilizada no tratamento de doenças autoimunes e câncer, especialmente no tratamento do linfoma, devido a sua afinidade por células de origem linfocitária. Porém, esta droga é um conhecido teratogênico, com seus efeitos teratogênicos descritos em várias linhagens de roedores assim como em seres humanos. Em murinos, quando administrada no início da gestação, esta droga inviabiliza a gestação, com taxas de 100% de perdas gestacionais. Apesar da sua já conhecida ação inflamatória, a droga é capaz de induzir um estado inflamatório, com o recrutamento de células do sistema imunológico para locais de inflamação e secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Nenhum estudo afim de desvendar os efeitos da ciclofosfamida no comportamento das células uNK durante a gestação foi conduzido até o momento, tampouco estudos que esclareçam os efeitos da ciclofosfamida no perfil inflamatório em camundongos prenhes. A droga é capaz de reduzir a contagem de células NK circulantes em animais não prenhes, assim como

aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de quimiocinas que atuam no recrutamento de células do sistema imunológico.

Há muito tempo, pesquisadores vem estudando a interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central. Citocinas pró-inflamatórias são capazes de sensibilizar o sistema nervoso central e é possível observar alterações orgânicas e comportamentais frente às alterações imunológicas. Nesse sentido, é nítido que o sistema nervoso central pode responder às alterações orgânicas induzidas pela ciclofosfamida.

Diante do exposto, o presente trabalho visou estudar de que maneira a ciclofosfamida interfere no comportamento das células uNK reativas à lectina DBA (Dolichos Biflorus Aglutinin), uma vez que estas células são sensíveis a um desequilíbrio na secreção de citocinas anti e pró-inflamatórias, assim como estudar os efeitos da ciclofosfamida na viabilidade gestacional e comportamento de camundongos prenhes e relacionar os achados com as alterações encontradas nas células uNK.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, descreveremos a biologia das células Natural Killer Uterinas (uNK), assim como considerações acerca da ciclofosfamida, seu uso em humanos e camundongos e seu papel no desenvolvimento de má-formações e teratogênese.

2.1 Células Natural Killer Uterinas

As células Natural Killer (NK) são células do sistema imune inato de linhagem linfocitária e compreendem cerca de 5% a 15% dos linfócitos circulantes – as NK circulantes (cNK) (HUDSPETH et al., 2013; COLUCCI et al., 2003). Estas células são derivadas da medula óssea cujas progenitoras são as CD34⁺ IL2R β -chaim⁺ (KALKUNTE et al., 2008; MOFFETT; COLUCCI, 2014). Estas células são classicamente caracterizadas como CD56⁺CD3⁻, distinguindo-se das CD56⁺CD3⁺ que correspondem a uma população mista de células NK e linfócitos T (CAMPBELL; HSEGAWA, 2013). As células NK conferem ao organismo defesa contra tumores e células infectadas por vírus (COOPER et al., 2001; SMYTH et al., 2005; SOJKA et al., 2014). As células NK recebem este nome devido a sua capacidade de realizar citotoxicidade espontânea pela liberação de grânulos citoplasmáticos contendo perforinas, granzimas (MORETTA et al., 2006; LIMA et al., 2014) e granulinas (RATSEP et al., 2014). Estas células atuam no sistema imune inato não requerendo sensibilização prévia para sua atividade citotóxica na resposta imune inata inicial (BHAT; ROMMELAERE, 2013). Porém, HUDSPETH et al. (2013) demonstraram que as NK podem participar da patogênese de doenças autoimunes, quando algum fator exacerba ou limita suas funções imunoregulatórias, alterando a homeostasia. Isso foi evidente no fígado, durante a hepatite autoimune, quando células NK estavam em contato íntimo com hepatócitos lesados.

Além da notável capacidade citotóxica das células NK, observamos também que as mesmas são fontes de citocinas como o IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CSF-1,

TGF- β , LIF e IL-2 (LI et al., 2014; GIULIANI et al., 2014), tanto que são classificadas como membro da família de células linfoides inatas do tipo I por secretarem IFN- γ e não secretarem citocinas do tipo II como as interleucinas IL-4, IL-13, IL-17 e a IL-22. A secreção destes fatores pela célula NK influencia de maneira significativa no recrutamento e função de várias células de origem hematopoiéticas, como, por exemplo, os linfócitos T, modulando as respostas imunes. (CAMPBELL; HSEGAWA, 2013; HE et al., 2012).

As células NK também interagem com outras células do sistema imune, como as células dendríticas (DC) e neutrófilos, tornando-se um dos efetores de uma rede reguladora do sistema imune adaptativo (CAMPBELL; HSEGAWA, 2013) sendo até mesmo capaz de aumentar a resposta imune frente a uma segunda infecção (SUN et al., 2009). As células dendríticas (DC) são células do sistema imune responsáveis e capazes de realizar fagocitose e por secretar determinadas citocinas como interferon do tipo I (IFN) e IL-12, onde as células NK podem ser ativadas tanto pelas citocinas secretadas pelas DC quanto pelo contato direto célula-célula com estas células. Já as NK's podem atuar facilitando a maturação das DC (importante na defesa do organismo contra tumores) ou matando DC imaturas, mostrando assim que as NK's atuam também na homeostasia destas células (LEE et al., 2013). Ambas as células também interagem com células NKT (células que compartilham características tanto das NK's quanto das células T – CD3+CD56+). As células NKT expressam receptores de células T como também secretam citocinas que as NK's secretam (IFN- γ e TNF- α). Sob ação da α -galactosilceramida as NKT's tornam-se ativas, ativando posteriormente as NK's e DC, mostrando que as NK's interagem também com outras células e não apenas as DC (LEE et al., 2013; CHIOSSONE et al., 2014).

As células NK inicialmente foram descritas como uma população homogênea de linfócitos (KIESSLING et al., 1975). Posteriormente, em humanos, estas células foram classificadas em dois subtipos cujos critérios para definição dos mesmos foi baseado na expressão de CD56 e CD16 (HELIGE et al., 2013). As células CD56^{dim}CD16⁺, que são totalmente maduras (CAMPBELL; HSEGAWA, 2013) são marcadas pela baixa expressão de CD56 (COOPER et al., 2001; PERUSSIA et al., 2005), representam aproximadamente 90% das NK

periféricas e sua característica marcante é a alta capacidade citotóxica (COOPER et al., 2001; KALKUNTE et al., 2008; GIULIANI et al., 2014). Já as células CD56^{bright}CD16⁻ correspondem a aproximadamente 5% a 15% das NK periféricas e suas principais características são a elevada taxa de secreção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 e GM-CSF e a baixa capacidade citotóxica. Quando estas células enfrentam ativação prolongada, elas podem apresentar atividade citotóxica e se diferenciar em células CD56^{dim}CD16⁺ (COOPER et al., 2001; KALKUNTE et al., 2008; ROMAGNANI et al., 2007; CHAN et al., 2007). As células CD56^{bright}CD16⁻ são abundantes em órgãos linfoides secundários, perfazendo aproximadamente 75% dos linfócitos em gânglios linfáticos e 50% no baço. A distribuição diferencial dos subtipos de acordo com o local anatômico (de acordo com seu papel na imunidade inata e vigilância imunológica) sugere especialização destas células baseada nos subtipos (CAMPBELL; HSEGAWA, 2013). As células CD56^{bright}CD16⁻ possuem alta expressão de L-selectinas, que são moléculas de adesão, sugerindo alta capacidade migratória desta subpopulação NK. Sua capacidade migratória não se restringe aos órgãos linfoides secundários. Elas possuem capacidade migratória para órgãos não-linfóides, como ocorre com o útero. No útero, no primeiro trimestre de gestação, às NK correspondem a 70% da população linfocitária (TRUNDLEY; MOFFET, 2004). Do restante, 20% correspondem a macrófagos (BULMER; WILLIAMS; LASH; 2010) até 10% de células T e NKT. Células B são raras no ambiente uterino durante a gestação. Evidências sugerem que os precursores das células uNK sejam recrutadas do ambiente externo (possivelmente medula óssea e baço) para o ambiente uterino e lá estas células se proliferam e diferenciam em células especializadas uNK (TAGLIANI et al., 2011; NANCI et al., 2012; ERLEBACHER et al., 2013).

Elas também apresentam alta expressão de marcadores como CD62L e CXCR3 o que causa um enriquecimento destas células em órgãos linfoides secundários e locais de inflamação. Em suma, os órgãos linfoides congregam um importante conjunto de células efetoras do sistema imune inato, já que apenas 2% dos linfócitos circulantes são CD56^{bright}CD16⁻ e mais de 40% desta subpopulação encontra-se nos linfonodos (FEHNIGER et al., 2003; VOSSHERICH et al., 2006; HAYAKAWA e SMYTH, 2006; FERLAZZO et al.,

2004; CAMPBELL; HSEGAWA, 2013). A população de células NK no ambiente uterino é diferente da população de células NK circulante principalmente em seu comportamento. A subpopulação de células NK uterinas possui sua expressão gênica alterada pelo ambiente uterino, tornando-a uma subpopulação específica (ERLENBACHER, 2013; RATSEP et al., 2014). Lá, estas células são de grande importância uma vez que há indícios que essas células neste microambiente auxiliam no desenvolvimento do embrião (ZHANG et al., 2010).

A natureza semi-alogênica do embrião (50% do material genético é paterno) interpõe um paradoxo: o paradoxo imunológico. Apesar da diferença genética existente entre mãe e feto, não observamos rejeição ao feto (em condições normais) e esta característica é desafiadora para os imunologistas da reprodução, que buscam respostas para a tolerância materna ao feto (HERBERGER, 2013). Podemos dizer que a gestação é um momento único para o sistema imunológico onde dois genomas distintos não produzem uma resposta negativa, não significando que não ocorra resposta (CO et al., 2013). Nesse contexto as células Natural Killer Uterinas (uNK em camundongos) surgem como atores centrais de uma intensa rede de normal que culminam com a tolerância materna ao feto e desenvolvimento adequado da gestação (TAKASHIMA et al., 2013). Apesar de observarmos células NK na circulação periférica, as células uNK possuem comportamento e características fenotípicas que as configuram como uma população única de células, como por exemplo, a secreção elevada de citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos (RATSEP et al., 2014; LI et al., 2014; LIMA et al., 2014). Qualquer desequilíbrio potencialmente poderá induzir falhas da gestação (CAO et al., 2013; ERLEBACHER, 2013). Entende-se por falhas na gestação ou falha reprodutiva a incapacidade de conceber ou a incapacidade de manter a gestação (infertilidade, falhas na implantação do blastocisto ou aborto) e as células NK podem interferir nessas variáveis (MEDINA et al., 2013; HAUMONTE et al., 2014; BEAMAN et al., 2014). Células NK também estão presentes no útero não grávido e sua quantidade varia de acordo com o ciclo menstrual. Durante a fase secretora, aproximadamente 30% de todas as células endometriais são Natural Killer (HATTA et al., 2013) perfazendo um total de 60% de todos os leucócitos no endométrio e as células NK estão presentes em maior número na fase secretora, decaindo nas outras

fases do ciclo (TANG et al., 2011). Aproximadamente 40% das células NK presentes no útero durante a fase secretora expressam Ki67, uma proteína relacionada com a proliferação celular, evidenciando que a proliferação mostra-se ativa (JONES et al., 1998; ACAR et al., 2011). A variação em número das células NK no ciclo hormonal sugere que exista uma regulação hormonal sobre proliferação de NK (as células uNK possuem receptores para estrogênio (ER-B) mas não possuem receptores para progesterona – a influência da progesterona parece ser indireta), fenômeno evidenciado por King et al. (1998) e Moffet-King (2002) onde o número de células NK variou em conformidade com a concentração de progesterona no endométrio.

Durante o processo de implantação, o útero passa por intensas transformações que facilitam a implantação e o estabelecimento do blastocisto no tecido endometrial. Os fibroblastos adquirem formato epitelióide, ocorrem alterações drásticas tanto na matriz extracelular quanto o perfil de expressão gênica dos fibroblastos (DEY et al., 2004; GELLERSEN; BROSENS; BROSENS; 2007; ERLNBACHER, 2013), na produção de citocinas (KURODA et al., 2013) e hormônios que, atuando em conjunto favorecem o controle da invasão do trofoblasto, nutrição, suporte do blastocisto e acúmulo e diferenciação de células imunes como as Natural Killer (ABRAHAMSOHM, 1983; ABRAHAMSOHM, 1993; APLIN; GLASSER, 1994).

Numa região próxima aos vasos mesometriais surge uma estrutura que originalmente e erroneamente foi nomeada de glândula metrial. Esse erro baseou-se no fato de que, em microscopia fotônica, o citoplasma das células que a compunha era rica em grânulos PAS positivos (PEEL et al., 1983). As células que a constituíam eram chamadas de células granulosas da glândula metrial e desde então sabia-se que estas células proliferavam-se intensamente após a implantação, atingindo seu pico por volta do 10º ddg (PEEL et al., 1983; SANCHÉZ et al., 1996). Estas células continham grânulos citoplasmáticos que eram densos e heterogêneos, com morfologia semelhante às células NK ativadas de camundongos (PEEL; BULMER, 1977; STEWART, 1983; PEEL et al., 1983; BUCKHARDT et al., 1990; PAFFARO JR. et al., 2003;). Após estudos de imunocitoquímica e imunoquímica, foi descrita a presença de perforina em seus grânulos (PARR et al., 1987; PARR et al., 1990; ZHENG et al., 1991), além

da expressão de marcadores de superfície como Thy-1 (BERNARD et al., 1978), CD45 (PARR et al., 1990), Asialo GM1 (MUKHTAR et al., 1989) e a não expressão de marcadores tanto para linfócitos T quanto para linfócitos B (WHITELAW; CROY, 1996). A partir dessas observações, foi sugerido que essas células desempenhariam papel importante em fenômenos imunes durante a gestação e estas células foram designadas como células da linhagem Natural Killer, as Natural Killer Uterinas (uNK) (PARR et al., 1987; PARR et al., 1990; ZHENG et al., 1991). Croy (1999) sugeriu então que o nome glândula metrial fosse substituído por agregado linfoide mesometrial da gestação (MLAp) constituído essencialmente por células natural killer uterinas (uNK).

No ambiente uterino, podemos encontrar células NK com diferentes fenótipos. Em humanos, ocorrem dois subtipos celulares, a eNK (Natural Killer endometrial) (MANASTER et al., 2008), que preferencialmente é encontrada no útero não grávido (MANASTER; MANDELBOIM, 2010) enquanto o segundo subtipo, a dNK (Natural Killer decidual) (HANNA et al., 2006) é unicamente encontrado no útero grávido na decídua (MANASTER; MANASTER et al., 2010). Pesquisas têm mostrado que um subtipo pode, através de algum estímulo, adquirir outro fenótipo. Em humanos, células $CD56^{dim}CD16^{+}$ podem, através de estímulos do TGF- β e da interleucina 15 (IL-15), se converterem em células $CD16^{-}$ (KESKIN et al., 2007). Isso foi evidenciado quando células eNK isoladas, tratadas com IL-15, passaram a expressar receptores NKp30 e NKp44, tipicamente expressos por dNK (MANASTER et al., 2008).

Diferenças também são observadas em camundongos, que possuem dois subtipos de uNK no ambiente uterino: uNK $PAS^{+}DBA^{-}$ cujos precursores são células uNK residentes no útero e o segundo subtipo, uNK $PAS^{+}DBA^{+}$ cujos precursores são de células circulantes. Células DBA positivas possuem maior potencial angiogênico e são produtoras de citocinas (ZHANG et al., 2010) enquanto células uNK $PAS^{+}DBA^{-}$ possuem um perfil mais citotóxico (LIMA et al., 2014b).

As células natural killer uterinas de camundongos, quanto aos marcadores, possuem fenótipo $CD3^{-}CD122^{+}$. Estas células também expressam receptores específicos de uNK, como os NKp46 e Ly49, mas não expressam NK1.1 e DX5 (YADI et al., 2008). Estas células também são positivas para

NKG2D assim como para B220 e CD11c⁺, portanto são CD3⁻/CD122⁺/NKp46⁺/NK1.1⁻/DX5⁻/NKG2D⁺/NCR1⁺/CD69⁺/CD177⁺. Células que possuem esse fenótipo possuem atividade citotóxica limitada quando comparadas com células NK circulantes (ERLENBACHER, 2013; HERGENGER, 2013, LIMA et al., 2014). Todo esse repertório de marcadores influencia de maneira sensível na função secretora, citotóxica e na sua capacidade de ligar-se ao MHC (complexo molecular de histocompatibilidade) (YADI et al., 2008). Células uNK residentes no útero não-grávido possuem um repertório diferente de marcadores, sendo portanto CD3⁻/CD122⁺/DX5⁺/NCR1⁺/CD69⁻/NK1.1⁺ (LIMA et al., 2014).

As células uNK são sensíveis à ação de hormônios esteroidais, como ocorre com a progesterona e estrogênio. As uNK possuem receptores para estrogênio mas não possuem receptores para progesterona. Mesmo não possuindo receptores, a progesterona atua de maneira indireta no comportamento das células uNK (KING et al., 1998; MOFFET-KING, 2002). Durante a decidualização, sob efeito da progesterona, as células deciduais secretam IL-15 e IL-11, que ligam-se à receptores das células uNK favorecendo o recrutamento, diferenciação e maturação destas células (KURODA et al., 2013).

Parece importante o papel das proteínas de adesão VCAM-1 para a permanência das células uNK em ambiente uterino. Durante a fase proliferativa, não observa-se expressão de VCAM-1 no endométrio enquanto na fase secretora ocorre expressão de VCAM-1. Através desta proteína, as células uNK podem ligar-se, por suas integrinas ($\alpha 4\beta 1$), permanecendo aderidas às células endoteliais (ACAR et al., 2011). Durante a gestação, a matriz extracelular rica em fibronectina proporciona um substrato ideal para migração para as células uNK, que interagem com ela através do ligante $\alpha 5\beta 1$. Mais do que um simples substrato para migração, a fibronectina parece ser importante para a sobrevivência das uNK, uma vez que a principal consequência da sua ausência é a redução, em número, de células uNK (ZAVAN et al., 2010).

Para o estudo das células uNK em camundongos, já foi amplamente utilizado o reagente PAS (ácido periódico de Schiff's) que possui limitações de análise (CROY et al., 2010) uma vez que não identifica formas imaturas de

células uNK (PAFFARO JR et al., 2003). O estudo citoquímico pode ser realizado através da coloração com lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) que liga-se seletivamente a glicoconjugados contendo N-acetil-D-Galactosamina, corando os grânulos citoplasmáticos e a membrana plasmática destas células. Segundo esses autores, quatro subtipos DBA+ foram encontrados no útero grávido: o subtipo 1 corresponderia à células arredondadas, pequenas ($9 \pm 3 \mu\text{m}$) com ausência de grânulos em seu citoplasma. Apresentavam núcleo arredondado e membrana fortemente marcada com lectina DBA. No subtipo 2 seriam células maiores ($13 \pm 2 \mu\text{m}$) com marcação positiva para lectina DBA tanto na membrana quanto em grânulos citoplasmáticos (poucos). No subtipo 3 as células marcadas apresentavam-se no seu estágio maduro e funcional. As células eram significativamente maiores ($26 \pm 7 \mu\text{m}$), apresentavam nucléolo denso e nítido, forma arredondada e muitos grânulos e superfície marcados com lectina DBA.. Já o subtipo 4 corresponderia às maiores células ($30 \pm 4 \mu\text{m}$), apresentando cromatina condensada, extensas áreas de extração citoplasmática e, áreas de descontinuidade na membrana, assemelhando-se à células em apoptose. Esse subtipo foi considerado como a forma senescente das uNK.

As células uNK secretam uma ampla variedade de citocinas. O pico de secreção de IFN- γ se dá no 10° ddg e coincide com o pico na expressão de eomesodesin, que parece regular a secreção de INF- γ (TAYADE et al., 2005). Seus grânulos são ricos em perforina, serina esterases, fosfatases (PARR et al., 1990) e glicoproteínas, como por exemplo, MUC-1 (CROY et al., 1997). Além disso, as uNK são também capazes de secretar GM-CSF, TNF- α , IL-1, IL11 (HERBENGER, 2013), TNF- β , IL-2 e IL-4 (YOKOTA et al., 2013).

O equilíbrio entre invasão trofoblástica excessiva ou inadequada depende de um equilíbrio entre sinais de ativação e inibição (BARAKONYI et a., 2013). As células NK uterinas, tanto em humanos quanto em camundongos, possuem uma grande variedade de receptores de ativação e inibição que modulam e controlam tanto a sua atividade citolítica quanto a secretora (YADI et al., 2008). Quando sinais de ativação superam sinais inibitórios, acontecem alterações no citoesqueleto visando a polarização de grânulos para liberação do seu conteúdo e a célula inicia seu papel citolítico (CO et al., 2013). Em humanos, os receptores KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like receptors*) são encontrados na membrana das

dNK e podem ser tanto ativadores quanto inibidores (YADI et al., 2008). Os KIR Ligam-se tanto com MHC-I clássicos (HLA-C) como aos não clássicos (HLA-E e HLA-G) e a interação destes com MHC-I não clássicos é importante para o estabelecimento da tolerância materna ao embrião, uma vez que regulam respostas imunes maternas negativas, bloqueando a atividade citotóxica (HERBENGER, 2013; BARAKONYI et al., 2013). Já a interação de receptores KIR inibitórios com HLA-C está relacionada com um aumento no risco de pré-eclâmpsia e aborto (HIBY et al., 2004; LIMA et al., 2014). A interação de KIR com moléculas de MHC também ativam as células uNK e estas passam a secretar citocinas, como mostrado por BEAMAN e colaboradores (2014) onde um aumento da secreção de GM-CSF foi evidenciado após ativação de KIR2DS1. A baixa expressão de HLA-G por parte do trofoblasto pode contribuir para a patogênese de doenças gestacionais como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento embrionário intra-uterino uma vez que menos receptores KIR2DL4 serão ativados e menos INF- γ será secretado pelas células uNK (HAUMONTE et al., 2014). O padrão de ativação e inibição das células uNK depende não só dos complexos moleculares de histocompatibilidade mas também do repertório de receptores KIR exibido pelas células uNK (MOFFETT e COLUCCI, 2014). Em camundongos, os receptores Ly49 (killer cell lectin-like receptor) são receptores análogos aos KIR encontrados em humanos e também podem ser tanto ativadores quanto inibidores da atividade uNK (YADI et al., 2008; MOFFETT; COLUCCI, 2014). Ly49 ativadores possuem um domínio ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) que auxilia na transmissão do sinal ativador enquanto Ly49 inibitórios possuem domínios inibidores ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) que atenuam a sinalização celular (CROY et al., 2003a). As células do trofoblasto de camundongos predominantemente expressam H2-K, um MHC de classe I cuja presença está associada à inibição da atividade citolítica via interação com receptores Ly49 inibitórios. Além disso, a sinalização mediada pelo H2-K provoca sinais imunes que suportam o desenvolvimento placentário adequado (HERNENGER, 2013; LIMA et al., 2014b) A baixa expressão de receptores Ly49 parece estar relacionada com problemas gestacionais como restrição do crescimento embrionário intra-uterino e perdas gestacionais recorrentes (LIMA et al., 2014). Já camundongos mutantes que possuíam receptores Ly49 inativos mostraram que a inatividade

desses receptores é incompatível com a gestação, uma vez que até mesmo a implantação do blastocisto fica comprometida, porém a secreção de perforina permanece constante nesses animais mostrando que, pelo menos a perforina, possui outros mecanismos indutores da sua expressão (RATSEP et al., 2014). Em resumo, foi observado que existe uma tendência de que receptores inibitórios da atividade citotóxica sejam expressos durante a gestação (CROY et al., 2003b).

Células dNK possuem receptores naturais de citotoxicidade que regulam a atividade produtora de citocinas (NKp30) e a atividade citotóxica da célula (NKp44 e NKp46) reconhecendo, por exemplo, proteínas virais em células infectadas e células tumorais. Os receptores naturais de citotoxicidade passam a ser expressos assim que o processo de maturação das células NK inicia-se em ambiente uterino (CHIOSSONE et al., 2014). Mulheres com histórico de pré-eclâmpsia geralmente possuem alterações na expressão desses receptores (como a redução da expressão de NKp46) (FUKUY; FUNAMIZU; YOKOTA; 2011; BARAKONYI et al., 2013). Já a o aumento da expressão de NKp46 por células CD56⁺ está relacionado com a infertilidade, endometriose e perdas gestacionais recorrentes (GIULIANI et al., 2014).

A expressão, em algum momento prejudicada, de IL-12 e IL18, conhecidas citocinas pró-inflamatórias, podem superar sinais inibidores nas uNK e desencadear um processo citolítico (CO et al., 2013).

O recrutamento e migração de células NK para o útero no camundongo coincidem com o processo de decidualização, evento que ocorre após a implantação do blastocisto. Este processo inicia-se por volta do quinto dia de gestação ao redor da cripta embrionária (RATSEP et al., 2015). Em humanos, o pico em número de células se dá por volta da oitava até a décima terceira semana de gestação (RAJAGOLAPAN, 2014). A expressão gênica diferencial é determinada pelo microambiente uterino e lá as células NK passam a exibir um fenótipo que as diferencia das demais populações de NK no organismo, passando a exibir, por exemplo, um fenótipo CD11b⁺CD27⁻, característico de células NK totalmente diferenciadas (LIMA et al., 2014; CHIOSSONE et al., 2014). Estudos realizados por HOFMANN et al. (2014) mostraram que após injetar células do baço de camundongos que possuíam apenas células NK em

camundongos depletados de linfócitos (BALB/c-Rag^{-/-}//2Rg^{-/-}) ocorria alto influxo de células NK para o ambiente uterino. O processo de migração de células para o útero compreende três processos: (1) os leucócitos aderem à parede do vaso sanguíneo; (2) ocorre migração dos leucócitos através da membrana do endotélio; (3) os leucócitos migram para o tecido uterino guiados por um gradiente de concentração de quimiocinas (KRUSE et al., 2002; CARLINO et al., 2008; MADIGAN et al., 2010; LIMA et al., 2014).

Uma grande variedade de quimiocinas possui a capacidade de atrair e alterar o comportamento das uNK. Elas são expressas tanto pela decídua basal como na MLAp (CAO et al., 2013). A CXCL10 e a CX3CL1 possuem a capacidade de atração de uNK porém alteram o fenótipo destas células para um estado citolítico. Alterações na expressão destas quimiocinas acontecem, por exemplo, durante a endometriose (BELLELIS et al., 2013). Outras quimiocinas atraem uNK com fenótipo menos citolítico, como por exemplo a CXCL9, CXCL11, XCL1 (BELLELIS et al., 2013), CXCL12, MCP-1, RANTES e a interleucina 6 (IL-6) (HANNA et al., 2003; ROSE et al., 2011). A quimiocina CXCL14 é altamente expressa na decídua basal e MLAp durante a gestação normal e a ausência de expressão desta quimiocina está relacionada com baixa população de uNK e distorções na remodelação vascular nesses animais (CAO et al., 2013). A quimiocina CCL3 é secretada pela célula trofoblástica em humanos e auxilia a recrutar e manter as células dNK na decídua durante a gestação (DRAKE et al., 2001). Experimentos mostraram que a droga Danazol também possui atividade de recrutamento de células uNK em ambiente uterino, alterando a expressão de receptores LY49 e aumentando a expressão de integrinas e M-CSF (KUSAKABE et al., 2007). Alterações no padrão de secreção de citocinas podem alterar a expressão tanto de quimiocinas quanto de seus receptores, assim como mostrou Li et al. (2014) onde a administração de IFN- γ aumentou a expressão de CX3CL1 no útero e do seu receptor (CX3CR1) em células NK com perfil predominantemente citotóxico, interferindo negativamente na gestação.

A proximidade entre as células do trofoblasto e as células uNK sugerem que exista alguma relação entre estas células. De fato, estas células interagem de modo que as uNK regulem a invasão do trofoblasto, importante para uma

gestação saudável (BARAKONYI et al., 2013). A evidência de que quem desempenha essa função é a uNK foi dada por Cao e colaboradores (2013) onde mostraram que células NK periféricas não possuem a capacidade de regular a proliferação do trofoblasto, apenas as uNK. Em humanos as células do citotrofoblasto (CTB) supra-regulam a expressão de ligantes inibitórios da capacidade citolítica e o HLA-G é um forte candidato (CO et al., 2013).

Ancorar-se na decídua talvez seja a principal função da invasão trofoblástica. A invasão trofoblástica induz alterações vasculares importantes no início da gestação que culminam no aumento do suprimento sanguíneo que sustentará o desenvolvimento embrionário (FITZGERALD et al., 2006). Aparentemente as uNK regulam o processo de invasão do trofoblasto não pelo processo citolítico mas sim pela secreção de citocinas. Os IFN- γ (HERBENGER, 2013), TNF- α , TNF- β (YOKOTA et al., 2013), TGF- β (CO et al., 2013) e Ang-2 (HANNA et al., 2006) possuem aparente influência inibitória na invasão do trofoblasto enquanto IL-8 e IP10 induzem a migração de células trofoblásticas (HANNA et al., 2006). Baixas tensões de oxigênio induzem a transcrição de genes que codificam fatores induzidos pela hipóxia (HIF) que induzem a proliferação e diferenciação do trofoblasto (CHAKRABORTY et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2013). Von Rango e colaboradores (2003) mostraram que células trofoblásticas em apoptose possuíam grande número de células uNK ao redor. Não está claro ainda se as uNK induziram apoptose ou se a apoptose liberou substâncias que atraíram as células uNK.

Como descrito até aqui, as células uNK possuem grande importância na manutenção da homeostasia gestacional. Grande parte dessa homeostasia reside no fato de que as uNK atuam ativamente no processo de remodelação vascular e angiogênese nos estágios iniciais da gestação (HOFFMAN et al., 2013; BEAMAN et al., 2014). Hoffman et al. (2014) mostraram através de um elegante estudo que linhagens de camundongos com ausência total de linfócitos (BALB/c-Rag^{-/-}//2Rg^{-/-}) apresentavam remodelação vascular aberrante, atrasos no desenvolvimento embrionário e perdas gestacionais elevadas até o 9,5º ddg e que o enxerto de células do baço de camundongos que possuíam apenas NK de população linfocitária reestabeleceu o processo de remodelação vascular. O processo de remodelação vascular consiste em transformações nas artérias

espiraladas (SCREEN et al., 2008) como a redução da camada vascular dos vasos (CHAKRABORTY et al., 2011), redução do número de células endoteliais (CROY et al., 2006; HERBENGER, 2013), substituição das células endoteliais por células do trofoblasto invasivo (ERLENBACHER, 2013) e redução da resistência vascular (CHAKRABORTY et al., 2013) resultando num aumento do suprimento sanguíneo para o feto (HOFFMAN et al., 2013). As uNK participam através da secreção de citocinas que medeiam esses processos, como o IFN- γ . Segundo Yu e colaboradores (2006) a ausência tanto de IFN- γ como do receptor para IFN- γ (IFN- γ R1) induzem uma remodelação arterial aberrante e clinicamente o resultado da remodelação vascular aberrante é a pré-eclâmpsia, a restrição do crescimento embrionário em ambiente intrauterino e o aborto (KAUFMANN et al., 2003; PJINENBORG et al., 2006). A remodelação vascular coincide localmente com a localização das células uNK e com a expressão de IFN- γ (ERLENBACHER, 2013) e temporalmente com o aumento em número de células uNK no 10º dgd. (HATTA et al., 2013). As células uNK também secretam na matriz metaloproteases (MMP) que degradam a matriz e facilitam a invasão do trofoblasto e substituição do endotélio vascular por trofoblasto (HERBENGER, 2013; LIMA et al., 2014). O próprio trofoblasto, tanto em humanos (citotrofoblasto extraviloso) como em camundongos (células trofoblásticas gigantes) auxiliam na secreção de proteases que degradam a matriz (HERBENGER, 2013). A MMP2 é importante neste contexto por permitir a invasão do trofoblasto e a MMP9 por atuar de modo intenso na remodelação das artérias espiraladas (LIMA et al., 2014; RATSEP et al., 2014)

As células uNK (camundongos) e dNK (humanos) também secretam outras citocinas que contribuem para o processo de remodelação vascular. As interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) parecem contribuir para o processo de placentação e remodelação vascular via receptores IL-6R α (para IL-6) e gp130 (para IL-8) (LIN et al., 2007). Em mulheres propensas ao aborto, a expressão destas duas citocinas encontravam-se reduzidas e seus úteros claramente apresentavam remodelação vascular prejudicada (PITMAN et al., 2013; LIMA et al., 2014). Outro estudo mostrou que mulheres propensas ao aborto exibiam maior número de células com fenótipo citotóxico (CD16⁺) e, por consequência, menores níveis de expressão de IL-6 e VEGF. Essas mulheres apresentavam

remodelação vascular aberrante (JUNOVICH et al., 2013). O VEGF possui papel importante no processo de remodelação vascular. A sinalização mediada por ela pode seguir dois caminhos distintos que culminam na remodelação vascular: a progesterona sintetizada pelo ovário aumenta a expressão de VEGF pelas células estromais da decídua e esse VEGF atua na angiogênese. Outra via é a síntese e secreção de VEGF pelas células uNK que atuam no processo de remodelação vascular (WANG et al., 2003; KIM et al., 2013). Camundongos expressam principalmente VEGFa, principal membro da família VEGF, que atua principalmente nos receptores VEGFR1 (FLT1) e VEGFR2 (KDR) (RATSEP et al., 2014). Células uNK DBA⁺ secretam VEGFa e no décimo dia aproximadamente 50% destas células secretam esta citocina (LIMA et al., 2014). As células uNK possuem receptores para VEGF (VEGF-R2 e VEGF-R3) que ativos aumentam ainda mais a secreção de VEGF. A angiopoietina 2 (Ang2) também atua via receptores Tie2 auxiliando na remodelação vascular e angiogênese, mas aparentemente o processo é mais sensível ao VEGF. A angiopoietina 2 também é importante para o processo de placentação (WANG et al., 2003; KIM et al., 2013; LIMA et al., 2014).

Outras moléculas atuam positivamente na angiogênese, como a ephrin B2 (EFNB2) (ZHANG et al., 2008), PGF- β (TAYADE et al., 2007) e a DLL-1. A DLL-1 (*delta-like ligant 1*) mostrou-se importante no processo de remodelação vascular e angiogênese. A ausência desta proteína é tão severa que as anomalias vasculares causadas pela sua ausência são incompatíveis com a vida. Aparentemente as células uNK secretam DLL-1. A expressão de DLL-1 na decídua coincide com a localização de células uNK e a ausência de células uNK reduziu a expressão de DLL-1 na decídua (DEGAKI et al., 2013).

A perforina parece desempenhar papel importante na remodelação das artérias espiraladas. Além de regular a morte de células da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, permitindo a migração de células endoteliais decíduais, ela é uma das efetoras do pruning, que poda/corta vasos nascentes em suas formas maduras (LIMA et al., 2014)

2.2 Ciclofosfamida

A ciclofosfamida é um agente alquilante utilizado no tratamento de determinados tipos de câncer e no tratamento de doenças autoimunes (GILANI e CHATZINOFF, 1983). Sua função imunossupressora baseia-se na capacidade de impedir a divisão celular, uma vez que esta droga impede a produção de DNA. Isso induz morte celular principalmente em células de tumor (ação anti-neoplásica) e células do sistema imune (ação imunossupressora) (OSTENSEN e FORGER, 2013; ACR, 2013). O uso da ciclofosfamida é indicado para o tratamento da Granulomatose de Wegner (AUZARE et al., 2000), Neoplasia Trofoblástica Gestacional (ALIFRANGIS et al., 2013), Vasculite (CLOWSE, 2013; PAGNOUX et al., 2013), Artrite reumatoide Refratária Grave (ACR, 2013), Lúpus Eritematoso Sistêmico (ACR, 2013; COSTAPINTO et al., 2012; HARWARD et al., 2012), Miosite (ACR, 2013), Escleroderma (ACR, 2013), Leucemia Linfoblástica Aguda (NAKASHIMA et al., 2013), Hemofilia adquirida induzida por artrite reumatoide (DROBIECKI et al., 2013), Carcinoma mamário (ISHIZUKA e SATOU, 2013), Transplantes alogênicos e autólogos de células tronco (WIKIEL et al., 2013), Linfomas Hodgkin e não Hodgkin (LATORRE et al., 2007; PEREZ et al., 2012), fibrossarcoma congênito (LOHI et al., 2012) e Nefrite Lúpica (MITWALLI et al., 2012). A ciclofosfamida é classificada como um quimioterápico pertencente à categoria D, que são drogas que mesmo apresentando riscos potenciais para o desenvolvimento do feto a necessidade justifica o uso (MONTEIRO et al., 2013). O tratamento de mulheres grávidas com câncer mostrou que a sobrevivência dessas mulheres é significativamente maior do que aquelas que esperavam o término da gestação para início do tratamento (CARDONICH et al., 2012).

O uso da ciclofosfamida está associado à efeitos secundários graves (ACR, 2013) mas a droga requer bioativação para tornar-se efetiva (MIRKES et al., 1984). Seu metabólito ativo mais teratogênico é a Fosforamida Mostarda (MIRKES et al., 1984). Quando administrada, a ciclofosfamida passa por bioativação principalmente em tecidos hepáticos (SPEILMAN, 1982). Lá, a ciclofosfamida passa por processo de hidroxilação mediada pelo Citocromo P450, sendo transformada em 4-hidroxi-ciclofosfamida. Nesse ponto a ciclofosfamida pode seguir dois caminhos: ser transformada em 4-

ketociclofosfamida, um metabólito não tóxico ou ser transformada em Aldofosfamida. Esse metabólito agora pode ser transformado enzimaticamente em 3 metabólitos: Carboxifosfamida (potencial tóxico reduzido), Acroleína (tóxica) e a Fosforamida Mostarda (altamente teratogênica). A formação de metabólitos tóxicos ocorre principalmente em células de tumor, onde esses metabólitos desempenham sua ação anti-tumor. (MIRKES et al., 1984). Spielman (1982) mostrou que tanto a fosforamida mostarda quanto a acroleína são carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas já que foram observados linfócitos circulantes com alterações estruturais em cromossomos e aberrações cromossômicas causadas pela troca de cromátides irmãs induzida pela ciclofosfamida. Slott; Hales (1986) mostraram que tanto a fosforamida mostarda quanto a acroleína eram teratogênicas quando administradas por via intra-amniótica. Evidências também sugerem que a 4-hidroxi-ciclofosfamida também exerça papel teratogênico mostrando que em cultura esse efeito foi observado (SLOTT e HALES, 1988). Acredita-se que haja um incremento de espécies reativas de oxigênio (ERO) pós-tratamento com ciclofosfamida e ERO's podem induzir efeitos teratogênicos como defeitos no sistema nervoso central e tecido esquelético, além de aumentar consideravelmente o risco de câncer (LOGSDON et al., 2012; AHMAD et al., 2012).

A ciclofosfamida, em camundongos, possui seu pico de concentração plasmática em 8 minutos, mesmo tempo que a droga necessita para atingir seu pico de concentração no útero. Após esse período, as concentrações de ciclofosfamida começam a cair sendo que 62,5% da droga é eliminada em 12 horas e 90% da droga é eliminada no período de 24 horas. Dados semelhantes foram obtidos no mesmo experimento em relação às concentrações da fosforamida mostarda (GIBSON;BECKER, 1970).

Em humanos, tem sido reportado na literatura o nascimento de bebês normais e com mal formações em mães que fizeram uso da ciclofosfamida e isto parece estar relacionado com o período da gestação em que a ciclofosfamida foi administrada, como por exemplo, no primeiro trimestre de gestação (JANSSEN;GENTA, 2000). A taxa de mal formações varia de 10 a 20% dos nascidos vivos (MONTEIRO et al., 2013). Como principais efeitos teratogênicos desta droga encontram-se a redução de peso e crescimento intra-uterino do

feto, supressão fetal da medula óssea, maior susceptibilidade do microambiente uterino à infecções e hemorragias, alta incidência de má formações em tecido esquelético, olhos e palato (JANSSEN;GENTA, 2000). Lazalde e colaboradores (2012) em relato de caso mostram um menino cuja mãe fez uso de ciclofosfamida durante o primeiro trimestre de gestação apresentou intensa restrição do crescimento intra-uterino, baixo peso ao nascimento, agenesia bilateral do polegar, hipospadia e criptorquidismo bilateral. As evidências revelam que a contraindicação da ciclofosfamida durante o primeiro trimestre de gestação. Durante o segundo semestre de gestação, esses efeitos não foram observados (NAKAJIMA al., 2013). Curiosamente Pirvulescu e colaboradores (2012) mostraram em relato de caso uma mulher que fez uso de ciclofosfamida na 15ª semana de gestação e não apresentou mal formações visíveis na criança pós nascimento. Visto que são evidentes os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida durante o primeiro trimestre de gestação, é importante planejar gestações em mulheres com doenças autoimunes que, em algum momento da gestação, podem requerer o uso da ciclofosfamida (OSTENSEN; FORGER, 2013; PAGNOUX et al., 2013).

O efeito teratogênico da ciclofosfamida foi descrito na literatura com detalhes em 1968, mostrando alto potencial teratogênico da ciclofosfamida em camundongos da linhagem SWISS que receberam doses de 5 a 40 mg/kg do medicamento. Ficou evidente que cada alteração possui seu período crítico onde a probabilidade é maior para que ela ocorra. Exencefalia, microcefalia, sindactilia e ausência de costelas ocorre preferencialmente entre os dias 12 e 13. O aumento do número de reabsorções uterinas ocorreu quando as doses foram dadas entre os dias 11 e 14 de gestação. As doses de 5, 10 e 20 mg/kg de ciclofosfamida foram suficientes para induzir também a redução drástica do peso fetal, aumento da polidactilia, caudas excêntricas, fissuras de palato, hidrocefalia externa e problemas na fusão de ossos longos. O tecido esquelético é muito sensível a ciclofosfamida. Também ficou claro que camundongos da linhagem SWISS são menos sensíveis que outras linhagens de camundongos aos efeitos deletérios da ciclofosfamida (GIBSON; BECKER, 1968). Coelhos expostos à ciclofosfamida numa dose de 50mg/kg foram positivos para fissura palatina, hipogonadismo e acentuado aumento da taxa de reabsorções (GERLINGER,

1964 *apud* GIBSON; BECKER, 1968). Na dose de 100mg, 100% dos fetos morreram e a dose de 300mg foi letal para coelhas prenhez. Gilani e Chatzinoff (1983) também mostraram que existe uma relação entre a dose e a resposta frente à ciclofosfamida.

Alguns dados na literatura são conflitantes. GIBSON; BECKER, (1968) observaram que a dose de 20mg/kg de ciclofosfamida, quando administrada no décimo dia de gestação, levava a uma taxa de 96% de reabsorções em camundongos SWISS enquanto BAILEY e colaboradores (2005) mostraram que a mesma dose deve ser escolhida quando a intenção é estudar os efeitos teratogênicos na prole sem mata-la, administrado os mesmos 20mg/kg no décimo dia de gestação em camundongos CD1. Uma possível explicação é que existem diferenças entre as linhagens mas de qualquer maneira já havia sido descrito na literatura que camundongos SWISS são mais resistentes aos efeitos teratogênicos da ciclofosfamida (GIBSON; BECKER, 1968).

Em camundongos, um aumento muito significativo nas taxas de reabsorção foi observado quando a dose de 40mg/kg foi administrada no décimo segundo dia e essas taxas são maiores com o desenvolvimento da gestação (GORIDODSKY et al., 1998). Nesses animais também foi notado um aumento da expressão de TNF- α , assim como a redução da expressão de CSF-1 e GM-CSF (GORIDODSKY et al., 1998; GORIDODSKY et al., 1999).

Em camundongos, outras doses também foram utilizadas para testar os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida, como demonstrou CARNEIRO e colaboradores (2002) onde 7,5mg por via sub-cutânea administrada no décimo primeiro dia de gestação foi suficiente para causar 60% de óbitos nos fetos nascidos assim como mal formações como protusão grave do cérebro, exoftalmia e polidactilia. 5mg e 7,5mg, também administrados por via subcutânea no décimo primeiro dia de gestação foram capazes de elevar as taxas de reabsorção, reduzir o peso fetal e número de fetos vivos assim como o peso da placenta (CHAHOUUD et al., 2002).

Estudos foram feitos para demonstrar os efeitos da ciclofosfamida no ciclo celular nas células embrionárias e para isso Heringová e colaboradores (2003) utilizaram ovos de galinha para estudar os efeitos da ciclofosfamida. Observaram

que houve um aumento substancial de células na fase S do ciclo celular e uma redução de células na fase G²/M, quando a droga foi administrada por via intra-amniótica nas doses de 0,5, 2, 4, e 8 µg. Segundo esses autores, isso indica uma paralização do ciclo celular e interrupção da proliferação, sendo essa a causa de efeitos estruturais e morte do embrião.

Em humanos sob uso da ciclofosfamida, foi observado um aumento nas taxas de menopausa prematura (GREEN et al., 2013) e aumento do risco de infertilidade (HAWARD et al., 2012). Amenorréia e falha ovariana foram relatadas em pacientes que usaram a ciclofosfamida. Os efeitos são observados tanto na administração oral como na endovenosa (EV). Sete doses de ciclofosfamida geraram infertilidade em 12% em mulheres enquanto 15 doses elevou esta taxa para 39%. Portanto, parece existir uma relação entre dose/efeito também na infertilidade (JANSEN; GENTA, 2000). Outro relato mostra que doses totais que variam de 6 gramas até 55 gramas induziram infertilidade em mulheres que, por 24 meses após tratamento, não engravidaram (MOREL et al., 2013). As taxas de infertilidade em mulheres acima dos 31 anos é maior que em mulheres mais jovens mostrando que a idade também é um fator agravante da infertilidade induzida (BEHRINGER et al., 2013). Existe uma relação inversamente proporcional entre dose e idade. Quanto maior a idade, menor a dose necessária para induzir danos ao ovário e infertilidade (PAGNOUX et al., 2013). A infertilidade associada com hipogonadismo foi observada em mulheres com Linfoma Hodgkin após tratamento com ciclofosfamida (BEHRINGER et al., 2013). O hormônio anti-muleriano pode ser usado como um marcador para falha ovariana induzida pela ciclofosfamida uma vez que em mulheres inférteis pós-ciclofosfamida esses níveis são reduzidos (MOREL et al., 2013) assim como um marcador para estimar o risco de infertilidade (PAGNOUX et al., 2013). Foi observado nessas mulheres uma sensível redução no número de oócitos viáveis (PAGNOUX et al., 2013) assim como no número de folículos primordiais que podem ser revertidos com a administração da ciclofosfamida associada com o fator de estimulação de colônias de granulócitos (G-CSF) (WIKIEL et al., 2013). Tem sido relatado também infertilidade masculina associada com o uso da ciclofosfamida. Foi observado nesses indivíduos infertilidade relacionada à azoospermia (PAGNOUX et al., 2013).

Em relato de caso, 3 mulheres que fizeram uso da ciclofosfamida para tratar Granulomatose de Wegner conseguiram engravidar com sucesso, uma delas com três gestações pós-tratamento (AUZARI et al., 2000).

Em modelos animais, a ciclofosfamida tem sido utilizada para induzir infertilidade (SUN et al., 2013). Em ratos da linhagem WISTAR é feita uma administração de 50mg/kg no primeiro dia de tratamento por via intra-peritoneal associado com mais 13 doses diárias de 8mg/kg e em camundongos da linhagem C57BL/6 é necessário apenas uma dose por via intra-peritoneal de 200mg/kg para induzir infertilidade (TAKEHARA et al., 2013).

As implicações na fertilidade no tratamento farmacológico para doenças autoimunes não são imediatamente considerados. O implemento de técnicas que minimizam os efeitos da ciclofosfamida na fertilidade são viáveis e mostram resultados em homens e mulheres como a criopreservação de esperma, assim como a criopreservação de oócitos em mulheres (PAGNOUX et al., 2013). O uso de contraceptivos também mostrou-se eficaz na prevenção da infertilidade durante o tratamento com ciclofosfamida e é importante por dois motivos: como a ciclofosfamida possui efeitos teratogênicos durante o primeiro trimestre de gestação, o contraceptivo seria uma alternativa para que essa mulher não engravidasse. Outro motivo é que os contraceptivos preservam a função ovariana evitando a infertilidade induzida pela ciclofosfamida (AUZARI et al., 2000). O uso do acetato de leuprolide reduz a difusão da ciclofosfamida no tecido ovariano e pode ser uma alternativa (PAGNOUX et al., 2013).

Além dos importantes efeitos teratogênico e indutor de infertilidade da ciclofosfamida, outros efeitos secundários estão relacionados com o uso deste medicamento. Foi observado um aumento considerável de nascimentos pré-termo e de casos de pré-eclâmpsia pós-tratamento com ciclofosfamida (HARWARD et al., 2012). Em relato de caso, uma gestante com câncer mamário em uso da ciclofosfamida durante o primeiro trimestre apresentou oligodrâmnio e pré-eclâmpsia, mostrando que a pré-eclâmpsia está positivamente associada ao uso da ciclofosfamida (SKATULLA et al., 2012).

A acroleína possui alto potencial urotóxico induzindo nos pacientes cistite e induz o aparecimento de câncer secundário ao tratamento (SLOTT e HALES,

1986). Além dos efeitos já descritos, a ciclofosfamida pode causar depressão hematopoiética, náuseas, vômitos, alopecia, retenção de líquidos e defeitos cardíacos (AHMAD et al., 2012).

Os efeitos secundários e deletérios da ciclofosfamida podem ser minimizados experimentalmente, por exemplo, através da administração de compostos THIOL mostrando-se eficaz contra os efeitos secundários do tratamento, mas observa-se também uma redução dos efeitos terapêuticos da ciclofosfamida (SLOT;HALES 1986). Estes pesquisadores também mostraram que a cisteína, N-acetilcisteína, glutathione e 2-mercaptoetanol sulfonato reduziram a incidência de mal formações induzidas pela ciclofosfamida. Extrato de chá verde foi utilizado com sucesso reduzindo sensivelmente a teratogenicidade induzida pela ciclofosfamida (anomalias cerebrais, na medula espinhal e esqueléticas) assim como a redução da morte embrionária e os compostos responsáveis por esse efeito são Catequinas e polifenóis presentes no chá verde que são antioxidantes e minimizam os efeitos do estresse oxidativo induzido pela ciclofosfamida (LOGSDON et al., 2012). Já foi descrito na literatura que associação entre o extrato de *Ipomoea carula* com a BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) reduziu significativamente os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida em ratos da linhagem WISTAR e o mecanismo se dá através da ativação do sistema imune induzindo incremento do fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), de interferon gama (IFN- γ) assim como interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3) que possuem a capacidade de modular os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida (LATORRE et al., 2007). Em humanos, a administração da ciclofosfamida durante a gestação em associação com glicocorticoides mostrou-se eficaz ao reduzir mal formações fetais e aumentar a probabilidade de sucesso gestacional (AUZARI et al., 2000). O ácido fólico em associação com extrato de soja mostrou ser eficiente na redução de defeitos no tubo neural induzidos pela ciclofosfamida em ratos da linhagem WISTAR (DARK et al., 2012). Em contrapartida a esses efeitos benéficos, determinadas substâncias podem potencializar os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida, como acontece com o extrato de licorice, que aumenta a expressão do citocromo P450, aumentando sensivelmente o

potencial teratogênico da ciclofosfamida em ratos da linhagem Sprague-Dawley (DARK et al., 2012).

Outro método claramente eficiente de minimizar os efeitos deletérios da ciclofosfamida durante a gestação é o procedimento de imunopotencialização materna. O procedimento baseia-se na imunização uterina com esplenócitos de ratos (enxerto xenogênico), ativando o sistema imune local provendo benefícios para o desenvolvimento embrionário. Após coleta dos esplenócitos, de 25 a 30 x 10⁶ esplenócitos são injetados em cada corno uterino três semanas antes do cruzamento (TORCHINSKI et al., 1994). Pequenas variações nesse procedimento são observadas, como mostrou Savion e colaboradores (2009) que realizaram o procedimento de imunização duas semanas antes do cruzamento. O procedimento de imunopotencialização materna claramente possui efeitos anti-teratogênicos onde os embriões possuem maior peso ao nascer e menor taxa de mal formações quando as mães eram expostas a doses de ciclofosfamida que variavam entre 15mg/kg até 40mg/kg assim como menor taxa de reabsorções quando comparado com animais não imunizados que receberam doses de ciclofosfamida (TORCHINSKI et al., 1994; TODER et al., 1996; GORIDOVSKI et al., 1999).

Goridovski e colaboradores, (1999) demonstraram o papel do CSF-1 na regulação do crescimento e diferenciação da placenta e como a ciclofosfamida interfere reduzindo sensivelmente a expressão de CSF-1. A imunopotencialização materna atuou modulando a expressão de CSF-1, aumentando o crescimento e diferenciação da placenta. Mas o que os pesquisadores tem abordado em publicações recentes é a capacidade da ciclofosfamida em alterar a expressão de moléculas pró e anti-apoptóticas e o papel da imunopotencialização materna na expressão destas moléculas (SAVION et al., 2003). A ciclofosfamida reduziu significativamente a expressão de bcl-2 (uma molécula anti-apoptótica) e aumentou consideravelmente a expressão de p53, observando que os embriões apresentavam alto número de células em apoptose 24 horas após a administração da ciclofosfamida (SAVION et al., 2003). A atividade das caspases também altera sob imunopotencialização materna, tanto as doses de 20mg/kg quanto 40mg/kg, aumentando significativamente a atividade das caspases 3, 8 e 9, efeitos revertidos pela

imunopotencialização quando a dose administrada foi de 20mg/kg (TORCHINSKI et al., 2006). A atividade da sub-unidade da NF- κ B p65 mostra-se reduzida sob uso da ciclofosfamida mostrando aumento da sua atividade em camundongos imunopotencializados (SAVION et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Observa-se na literatura alto índice de mal formações embrionárias relacionadas ao uso da ciclofosfamida, assim como alto índice de perdas embrionárias nos experimentos realizados tanto em camundongos (SWISS, ICR e C57CL/6) como em ratos (Wistar e Sprague-Dawley) e coelhos. Como as células uNK tem papel fundamental no sucesso gestacional, justifica-se o estudo dos efeitos da ciclofosfamida no comportamento e na expressão de N-acetil-D-galactosamina por estas células, as quais são os leucócitos mais proeminentes e mais estudados do microambiente uterino de humanos e roedores.

4 OBJETIVOS

A seguir descreveremos os objetivos do trabalho, tanto gerais quanto específicos.

4.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da administração da ciclofosfamida no comportamento, viabilidade gestacional, morfologia uterina e na incidência dos subtipos de uNK reativos à lectina DBA por meio de estudo etológico, estudo morfológico, citoquímico e estereológico.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar o comportamento dos camundongos prenhes submetidos ao tratamento com ciclofosfamida quanto aos parâmetros de ansiedade e depressão;

Avaliar a viabilidade gestacional, morfologia do útero e das células uNK de camundongos prenhes submetidos à dose única de ciclofosfamida;

Avaliar a expressão de N-acetil-D-galactosamina nas células uNK por meio de procedimento citoquímico com lectina DBA nos cortes histológicos do útero de camundongos submetidos ao tratamento com ciclofosfamida;

Quantificar a incidência e a distribuição de células uNK DBA positivas em cortes histológicos obtidos de sítios de implantação de camundongos prenhes submetidos ao tratamento com ciclofosfamida e relacionar os resultados com as alterações na viabilidade gestacional e alterações comportamentais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a metodologia utilizada no experimento será descrita nas próximas seções.

5.1 Animais

No projeto, aprovado pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG sob registro de nº 546\2013 (ANEXO A), foram utilizadas um total de 120 fêmeas e 10 machos de camundongos da linhagem Swiss, obtidos no biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em um regime de alimentação e oferta de água *ad libitum* num ciclo de 12/12 horas claro e escuro. Os animais foram acasalados com machos da mesma linhagem e o

dia em cuja manhã foi detectada a rolha vaginal foi considerado como primeiro dia de gestação (1º ddg) (PAFFARO JR et al., 2003).

5.2 Protocolo de tratamento

Os grupos experimentais, assim como o protocolo de tratamento nos animais utilizados no experimento serão descritos a seguir.

5.2.1 Organização dos grupos experimentais

Para análise morfológica, citoquímica e estereológica, todos os camundongos utilizados no experimento tiveram seus sítios de implantação embrionária analisados no 10ºddg, dia em que foi observado um pico na secreção de IFN- γ (ASHKAR; CROY et al., 1999) e no número de células uNK (PAFFARO JR et al., 2003). Os testes de comportamento também foram realizados no 10ºddg.

Com o objetivo de analisar os efeitos da ciclofosfamida, em sua dose teratogênica (40mg/kg), na morfologia uterina, no comportamento das células Natural Killer reativas à lectina DBA na região mesometrial dos sítios de implantação de camundongos Swiss fêmeas no décimo dia de gestação (10º ddg) (n=5) e no comportamento dos animais referentes à depressão e ansiedade (n=10), os seguintes grupos experimentais foram propostos:

Tabela 1 – Grupos experimentais para análise no décimo dia de gestação (10ºddg)

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTO	TEMPO APÓS TRATAMENTO
Grupo CY + 1 hora	Ciclofosfamida (40mg/kg) - 10º ddg	1 hora
Grupo CT + 1 hora	Controle (SF0,9%) - 10ºddg	1 hora
Grupo CY + 2 horas	Ciclofosfamida (40mg/kg) - 10º ddg	2 horas

Grupo CT + 2 horas	Controle (SF0,9%) - 10°ddg	2 horas
Grupo CY + 48 horas	Ciclofosfamida (40mg/kg) - 8° ddg	48 horas
Grupo CT + 48 horas	Controle (SF0,9%) - 8° ddg	48 horas

Fonte: do autor

Com o objetivo de avaliar os efeitos da ciclofosfamida na gestação a termo (n=5), os seguintes grupos foram propostos:

Tabela 2 – Grupos experimentais para análise da gestação a termo

GRUPOS EXPERIMENTAIS	TRATAMENTO	TEMPO APÓS TRATAMENTO
Grupo CY no 8°ddg	Ciclofosfamida (40mg/kg) - 8° ddg	13 dias
Grupo CT no 8°ddg	Controle (SF0,9%) - 8°ddg	13 dias
Grupo CY no 10°ddg	Ciclofosfamida (40mg/kg) - 10° ddg	11 dias
Grupo CT no 10°ddg	Controle (SF0,9%) - 10°ddg	11 dias

Fonte: do autor

5.2.2 Administração da Ciclofosfamida

A ciclofosfamida (Sigma Chemicals CO. USA) foi administrada em dose única nos animais dos grupos CY + 1 hora e CY + 2 horas por via intraperitoneal no 10°ddg na dose de 40mg/kg, agindo por 1 e 2 horas respectivamente e os animais do grupo CY + 48 horas a ciclofosfamida foi administrada no 8° ddg, agindo por 48 horas. Os grupos controle CT + 1 hora e CT + 2 horas receberam uma dose de solução salina (SF0,9%) na dose de 0,5ml por via intraperitoneal no 10°ddg nos intervalos de 1 e 2 horas respectivamente e os do grupo CT + 48 horas no 8°ddg, agindo por 48 horas. Os animais foram submetidos à eutanásia por meio de anestésico inalatório (Isoflurano), foi feita a laparotomia e os sítios de implantação foram fotografados, contados e coletados para processamento.

Para análise dos efeitos da ciclofosfamida na gestação a termo, o grupo CY no 8ºddg recebeu a droga, na dose de 40mg/kg no oitavo dia de gestação e os animais do grupo CY no 10ºddg receberam a mesma dose no décimo dia de gestação. Os grupos controle CT no 8ºddg e CT no 10ºddg receberam a dose de 0,5ml de Soro Fisiológico 0,9% no oitavo e décimo dia de gestação, respectivamente. Foi analisado, no vigésimo primeiro dia de gestação (21ºddg) o ganho de peso das fêmeas, assim como o número de filhotes vivos, peso e tamanho dos filhotes, presença de má formações e as características macroscópicas do útero caso não houvesse nascimento de filhotes. Para tanto, os animais foram submetidos à eutanásia através de anestésico inalatório (Isoflurano) e foi procedida a laparotomia para análise e coleta dos úteros.

5.3 Análise comportamental

A seguir, segue a descrição dos protocolos dos testes de comportamentos referentes à ansiedade e depressão.

5.3.1 Análise da ansiedade

O labirinto em cruz elevado é um método amplamente utilizado e aceito para avaliar a ansiedade e efeito de drogas ansiolíticas e ansiogênicas. O aparato consiste num labirinto elevado (50cm de altura) que possui dois braços abertos (50 X 10cm cada), dois braços fechados (50 X 10 X 40cm cada) e uma plataforma central (10 X 10cm) formando uma cruz suspensa. Os animais foram colocados na plataforma central de frente para um dos braços fechados e o teste foi filmado por 5 minutos. As medidas comportamentais que foram registradas foram a frequência de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência do animal nos braços abertos e fechados. Um aumento da permanência e de entradas no braço aberto corresponde a um comportamento ansiolítico (LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; SOLATI et al., 2015).

5.3.2 Análise da depressão

Este estudo é baseado no conceito de que o animal, suspenso pela cauda, alterna seu comportamento entre períodos de agitação e imobilidade. Os animais foram fixados pela cauda numa placa de madeira distante 35cm do chão. O teste foi filmado por 6 minutos para a análise do comportamento e o primeiro minuto foi descartado. As medidas comportamentais registradas foram: latência (período de tempo em que o animal apresenta o primeiro evento de imobilidade), número de eventos de imobilidade durante o experimento e tempo total de imobilidade durante o experimento. O aumento seletivo de imobilidade durante o teste indica comportamento do tipo depressivo (STERU et al., 1985; THIERRY et al., 1986).

5.4 Análise da taxa de viabilidade

Para a realização desta análise foram contados de todos os animais utilizados neste experimento o número total de sítios de implantação, assim como o número de sítios viáveis e em aparente reabsorção.

Para o cálculo da porcentagem de embriões viáveis, foi utilizado a seguinte fórmula:

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

NS

Onde: (V) corresponde à porcentagem de sítios viáveis, (SV) ao número de sítios viáveis e (NS) o número total de sítios.

5.5 Análise morfológica e citoquímica

Para a análise morfológica, os seguintes protocolos foram propostos:

5.5.1 Procedimento de embebição em parafina

Após perfusão com paraformaldeído 4% em solução tampão fosfato 0,1M pH7,4, os sítios de implantação embrionária foram coletados, desidratados em gradientes crescentes de etanol, diafanizados em xilol para procedimento de embebição em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 7 μ m de espessura dos blocos. Os cortes foram montados em lâminas revestidas de poli-L-lisina a 10%, submetidos à coloração rotineira com Hematoxilida e Eosina para avaliação morfológica e histoquímica com lectina DBA.

5.5.2 Procedimento de histoquímica com lectina DBA (Dolichus Biflorus Agglutinin)

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados utilizando Xilol por duas vezes durante 20 minutos, seguido por hidratação com gradientes decrescentes de etanol por 5 minutos (etanol absoluto I, II e III, 95°, 80°, 70° e água destilada). Após a reidratação, os cortes foram submetidos à reação de citoquímica com Lectina DBA da seguinte maneira:

- a) Lavagem com PBS (*phosphate buffer saline*) 0,05M pH 7,4 10 vezes utilizando pipeta e aspiração;
- b) Incubação com H₂O₂ (30 volumes) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- c) Lavagem com PBS (*phosphate buffer saline*) 0,05M pH 7,4 10 vezes utilizando pipeta e aspiração;

- d) Incubação com PBS/BSA (albumina de soro bovino) 1% durante 30 minutos;
- e) Incubação com lectina DBA (*dolichus biflorus*) biotinada (Sigma Chemical CO. USA) diluída na proporção de 1:300 em PBS 0,05M pH7,4 *overnight* a 4°C;
- f) Lavagem com PBS (*phosphate buffer saline*) 0,05M pH 7,4 10 vezes utilizando pipeta e aspiração;
- g) Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical CO. USA) em PBS 0,05M diluída na proporção de 1:300 durante 1 hora;
- h) Lavagem com PBS (*phosphate buffer saline*) 0,05M pH 7,4 10 vezes utilizando pipeta e aspiração;
- i) Incubação com solução trabalho de DAB (3-3 diaminobenzidina) (Sigma Chemical CO. USA) (250µL) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H₂O₂ (30 volumes) (20µL) por 5 a 10 minutos sob vigilância da intensidade da reação em microscopia de luz;
- j) Lavagem com água destilada;
- k) Contra-coloração com Hematoxilida por 30 segundos;
- l) Os cortes foram desidratados em gradientes crescentes de etanol, diafanizados com xilol, montados em meio permanente com bálsamo do Canadá para observação ao microscópio fotônico (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado adicionando o glicoconjugado contendo N-acetil-galactosamina junto com a lectina DBA para incubação.

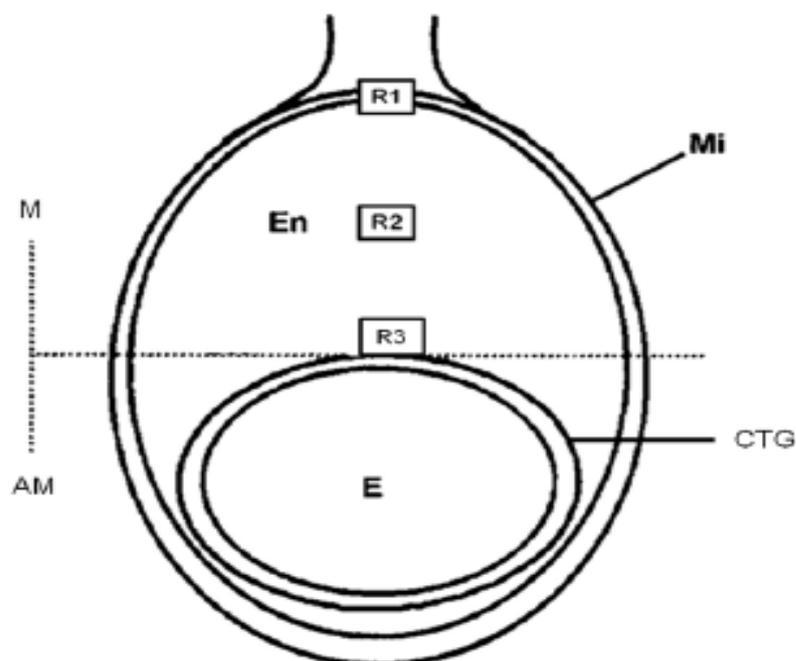
5.5.3 Estudo Estereológico em microscopia fotônica

Tão logo a amostragem para quantificação foi obtida, foi realizado o estudo estereológico como segue abaixo:

Foram analisados, de maneira aleatória, 1 corte histológico de 3 sítios de implantação distintos por animal que foram submetidos à citoquímica com lectina

DBA, precedentes 5 animais de cada grupo para análise estereológica. Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste (AT) de $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ dos 4 subtipos de uNK nas três regiões do útero prenhe dos camundongos (FIGURA 1) (modificado de PAFFARO JR et al., 2003). A delimitação destas regiões obedece a variações decorrentes do crescimento uterino de acordo com o dia de gestação. A área teste foi delimitada de acordo com o sistema de teste quadrático contendo duas linhas de exclusão. Foram contadas as células que estavam dentro da área teste exceto aquelas que estavam em contato com as duas linhas de exclusão.

Figura 1 – Estudo estereológico em microscopia fotônica



Nota: este diagrama representa um sítio de implantação no 10ºddg. As áreas R1, R2 e R3 foram utilizadas para quantificação dos subtipos das células uNK. M, região mesometrial; AM, região antimesometrial; En, endométrio; Mi, miométrio; E, embrião; CTG, células trofoblásticas gigantes.

Fonte: modificado de Paffaro Jr et al. (2003).

5.6 Análise Estatística

Uma vez que o estudo representa um delineamento inteiramente casualizado (DIC), a análise estatística foi realizada por meio de análise da distribuição dos dados e teste de normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov, seguida pelo teste t não pareado. Quando os pre-supostos de normalidade e homocedasticidade não foram satisfeitos, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Para a análise de três ou mais grupos, foi realizado o teste ANOVA (one way analysis of variance) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Quando os pressupostos de normalidade não foram satisfeitos, foi procedido o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós teste de Dunns. Foram considerados indicativos de significância $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

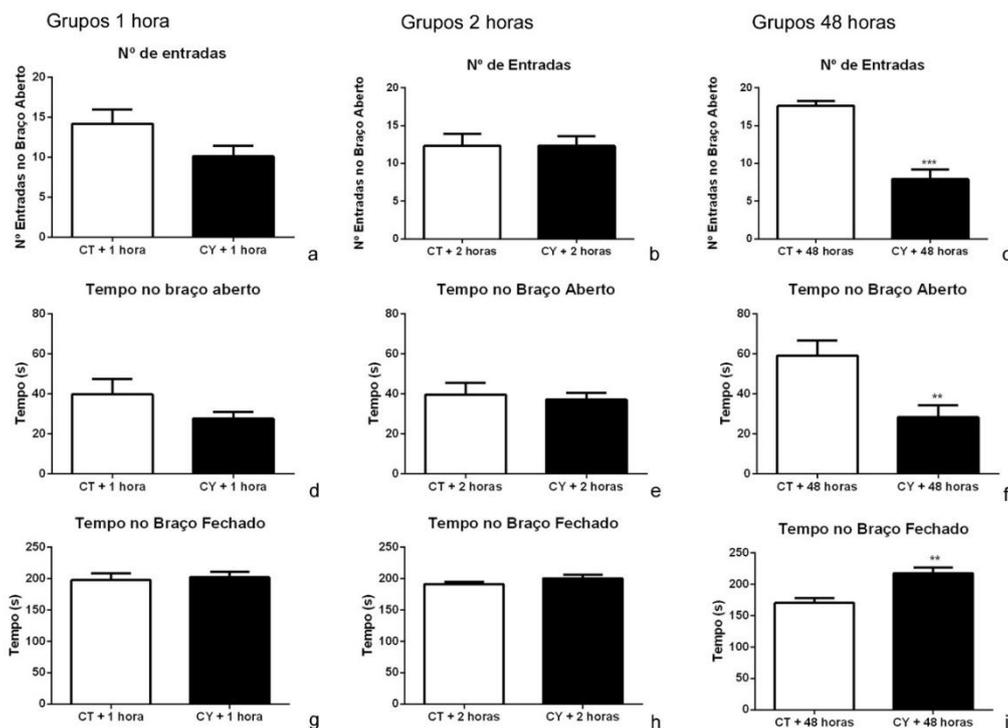
Nesta seção, descreveremos os resultados obtidos durante a execução de nossos experimentos desde a análise comportamental até o estudo estereológico.

6.1 Análise Comportamental

A análise comportamental, tanto para avaliar os efeitos da droga nos parâmetros de ansiedade (Labirinto em Cruz Elevado) (Figura 2) quanto os da depressão (Suspensão pela Cauda) (Figura 3) mostraram que a ciclofosfamida, agindo por curtos períodos de tempo (1 e 2 horas), não causou mudanças estatisticamente significativas em todos os parâmetros analisados. No teste de labirinto em cruz elevado, não foi possível observar alterações no número de entradas no braço aberto entre os grupos CT + 1 hora ($14,20 \pm 1,769$) e CY + 1

hora ($10.10 \pm 1,345$) ($p=0,4273$) (Figura 2a), assim como no tempo de exploração no braço aberto entre os grupos CT + 1 hora ($39,70 \pm 7,658$) e CY + 1 hora ($27,50 \pm 3,494$) ($p=0,1644$) (Figura 2d) e no tempo de exploração no braço fechado entre os grupos CT + 1 hora ($197,3 \pm 10,96$) e CY + 1 hora ($201,9 \pm 8,363$) ($p=0,5693$) (Figura 2g). No teste de suspensão pela cauda, também não houve diferenças na latência entre os grupos CT + 1 hora ($85,40 \pm 16,50$) e CY + 1 hora ($58,60 \pm 13,79$) ($p=0,7555$) (Figura 3a), assim como no número de eventos de imobilidade entre os grupos CT + 1 hora ($8,4 \pm 1,352$) e CY + 1 hora ($9,2 \pm 1,436$) ($p=0,6898$) (Figura 3d) e o tempo de imobilidade entre os grupos CT + 1 hora ($79,6 \pm 12,16$) e CY + 1 hora ($90,80 \pm 14,52$) ($p=0,5617$) (Figura 3g). Já na comparação entre os grupos de 2 horas, no teste do labirinto em cruz elevado, não houve diferenças estatisticamente significativas no número de entradas no braço aberto entre os grupos CT + 2 horas ($13,30 \pm 1,599$) e CY + 2 horas ($12,30 \pm 1,309$) ($p=1,0000$) (Figura 2b), assim como no tempo de exploração no braço aberto entre os grupos CT + 2 horas ($39,60 \pm 5,77$) e CY + 2 horas ($37,00 \pm 3,399$) ($p=0,7024$) (Figura 2e) e no tempo de exploração no braço fechado entre os grupos CT + 2 horas ($190,9 \pm 3,725$) e CY + 2 horas ($200,3 \pm 6,065$) ($p=0,2031$) (Figura 2h). De maneira semelhante, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas no teste de suspensão pela cauda na latência entre os grupos CT + 2 horas ($70,10 \pm 9,439$) e CY + 2 horas ($60,30 \pm 7,419$) ($p=0,4250$) (Figura 3b), assim como no número de eventos de imobilidade entre os grupos CT + 2 horas ($10,60 \pm 1,551$) e CY + 2 horas ($13,20 \pm 1,381$) ($p=0,2265$) (Figura 3e) por fim no tempo imóvel entre os grupos CT + 2 horas ($67 \pm 7,864$) e CY + 2 horas ($77,5 \pm 6,689$) (Figura 3h).

Figura 2 – Teste do Labirinto em Cruz Elevado



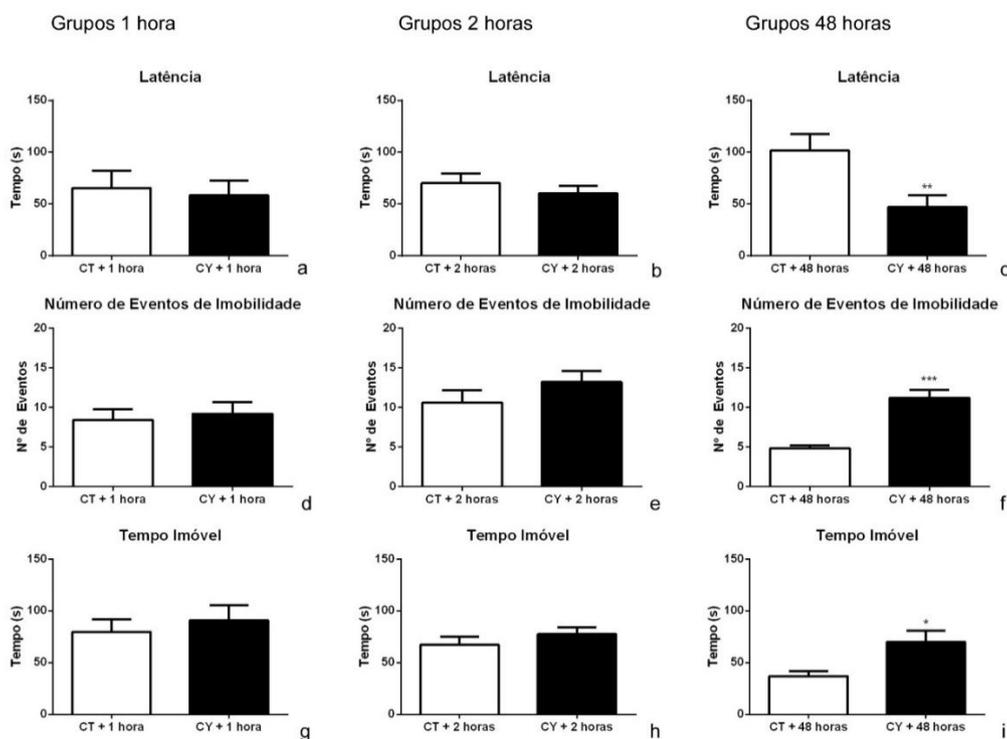
Nota: teste de labirinto em cruz elevado no décimo dia de gestação (10ddg) dos grupos controle (CT + 1 hora, CT + 2 horas e CT + 48 horas) e tratados com ciclofosfamida (CY + 1 hora, CY + 2 horas e CY + 48 horas). Nº de entradas (a-c), tempo no braço aberto (d-f) e tempo no braço fechado (g-i). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

Porém, com tempo de ação prolongado (48 horas) da ciclofosfamida, foi possível observar alterações em todos os parâmetros analisados, em ambos os testes. No teste de labirinto em cruz elevado, o número de entradas no braço aberto foi maior no grupo CT + 48 horas ($17,60 \pm 0,67$) quando comparado com o grupo CY + 48 horas ($7,9 \pm 1,295$) ($p < 0,0001$) (Figura 2c). Houve diferenças também no tempo de exploração no braço aberto entre os grupos CT + 48 horas ($59,10 \pm 7,524$) e CY + 48 horas ($28,20 \pm 6,189$) ($p = 0,0053$) (Figura 2f) assim como no tempo de exploração no braço fechado entre os grupos CT + 48 horas ($170,1 \pm 7,862$) e CY + 48 horas ($217,3 \pm 9,415$) ($p = 0,0012$) (Figura 2i). No teste de suspensão pela cauda, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na latência entre os grupos CT + 48 horas ($101,7 \pm 15,7$) e CY + 48 horas ($47,20 \pm 11,05$) ($p = 0,0068$) (Figura 3c), assim como no número de eventos de imobilidade entre os grupos CT + 48 horas ($4,8 \pm 0,3887$) e CY + 48 horas ($11,20 \pm 0,9752$) ($p < 0,0001$) (Figura 3f) e por fim no tempo imóvel entre os grupos

CT + 48 horas ($38,80 \pm 4,765$) e CY + 48 horas ($70 \pm 10,68$) ($p=0,0109$) (Figura 3i).

Figura 3 – Teste de Suspensão pela Cauda



Nota: teste de suspensão pela cauda no décimo dia de gestação (10ddg) dos grupos controle (CT + 1 hora, CT + 2 horas e CT + 48 horas) e tratados com ciclofosfamida (CY + 1 hora, CY + 2 horas e CY + 48 horas). Latência (a-c), número de eventos de imobilidade (d-f) e tempo imóvel (g-i). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

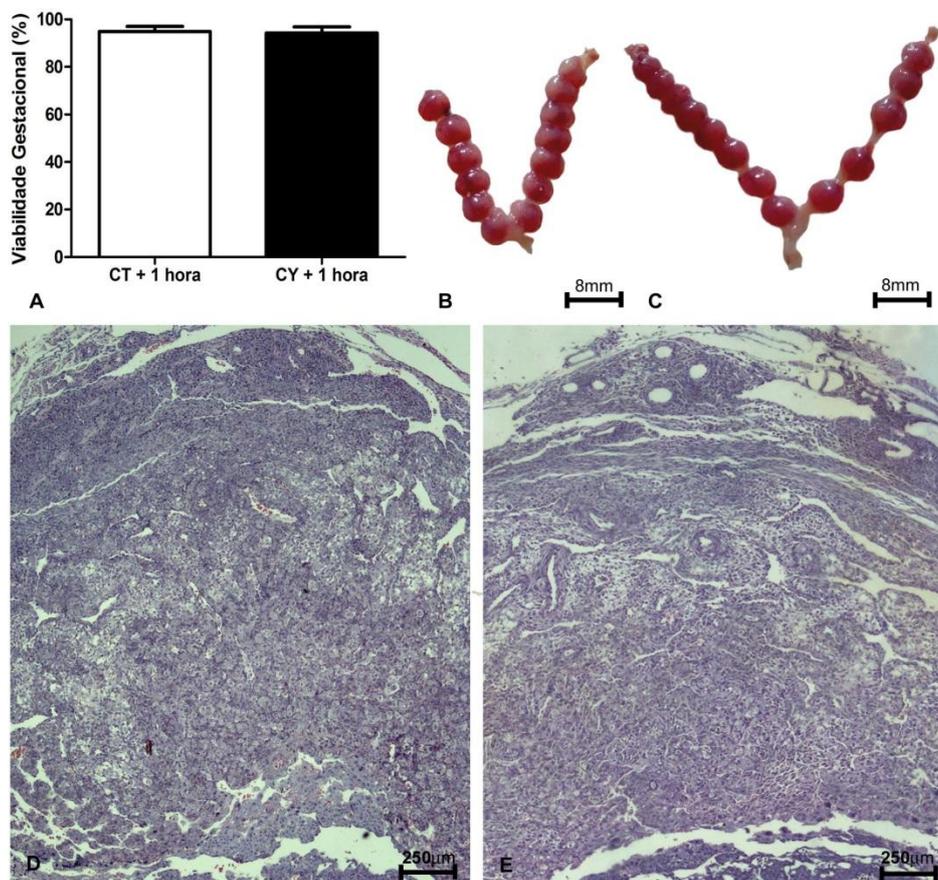
Fonte: do autor.

6.2 Análise da Viabilidade Gestacional

A análise da viabilidade gestacional mostrou que a ciclofosfamida não alterou a viabilidade gestacional com o período de ação de 1 hora (Figura 4). A análise macroscópica mostrou que os úteros possuíam dois cornos com sítios de implantação com aspecto normal tipo “colar de contas”, sendo que hemorragias e reabsorções eram esporádicas e não significativas estatisticamente tanto no grupo CT + 1 hora (Figura 4b) quanto no grupo CY + 1 hora (Figura 4c). A taxa de viabilidade gestacional também não mostrou

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CT + 1 hora e (94,90%±2,129) e o grupo CY + 1 hora (94,24%±2,571) ($p=0,8467$) (Figura 4a).

Figura 4 – Análise da Viabilidade Gestacional – Grupos 1 hora



Nota: Análise da taxa de viabilidade gestacional (4a). Análise macroscópica dos sítios de implantação no décimo dia de gestação dos grupos CT + 1 hora (4b) e CY + 1 hora (4c). Fotomicrografia dos sítios de implantação do décimo dia de gestação com coloração em Hematoxilina e Eosina dos grupos CT + 1 hora (4d) e CY + 1 hora (4e). $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**), $p<0,001$ (***)

Fonte: do autor.

A análise morfológica dos sítios confirmou os dados anteriormente descritos, onde os sítios possuíam as regiões e estruturas características para o dia de gestação, com regiões mesometrial e anti-mesometrial distinguíveis, com embrião implantado na região anti-mesometrial, região mesometrial rica em vasos sanguíneos por onde circula o sangue materno e região de interação materno-fetal entre as regiões, sem hemorragias e reabsorções visíveis, tanto no grupo CT + 1 hora (Figura 4d) quanto no grupo CY + 1 hora (Figura 4e).

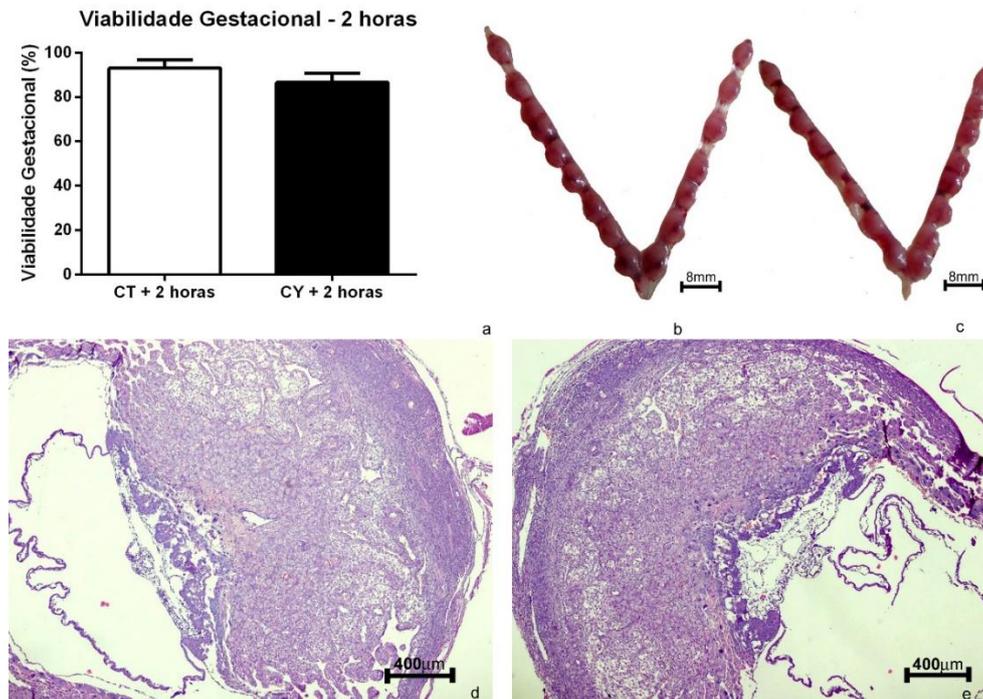
A análise da viabilidade gestacional também mostrou que a ciclofosfamida não altera a viabilidade gestacional com 2 horas de ação da droga. Os sítios

também eram característicos para o décimo dia de gestação, apresentando dois cornos uterinos com sítios de implantação com aspecto normal tipo “colar de contas” e hemorragias e reabsorções esporádicas e não significativas tanto no grupo CT + 2 horas (Figura 5b) quanto no grupo CY + 2 horas (Figura 5c). A análise das taxas de viabilidade gestacional também não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CT + 2 horas como entre os grupos CT + 2 horas (93,08%±1,763) e o grupo CY + 2 horas (86,55%±4,218) (p=0,2763) (Figura 5a).

A análise morfológica dos sítios de implantação dos grupos 2 horas também mostrou que a ciclofosfamida, agindo por duas horas, não foi capaz de inviabilizar a gestação até esse período, já que os sítios possuíam as regiões e estruturas características para o dia de gestação, com regiões mesometrial e anti-mesometrial distinguíveis e características para o dia gestacional, com embrião implantado na região anti-mesometrial, região mesometrial rica em vasos sanguíneos por onde circula o sangue materno com região de interação materno-fetal entre as regiões e sem hemorragias e reabsorções visíveis, tanto no grupo CT + 2 horas (Figura 5d) quanto no grupo CY + 2 horas (Figura 5e).

Entretanto, a análise da viabilidade gestacional dos grupos 48 horas mostrou que, com 48 de ação da ciclofosfamida (CY + 48 horas), as taxas de viabilidade gestacional caíram significativamente (32,91%±8,642) quando comparado com o grupo controle CT + 48 horas (95,70%±1,763) (p=0,0001) (Figura 6a). Nesses animais (CY + 48 horas), o ganho de peso mostrou-se significativamente reduzido (0,84g±0,3368) quando comparado com o ganho de peso dos animais controle CT + 48 horas (2,932±0,4424) (p=0,0014) (Figura 6b).

Figura 5 – Análise da Viabilidade Gestacional – Grupos 2 horas



Nota: Análise da taxa de viabilidade gestacional (5a). Análise macroscópica dos sítios de implantação no décimo dia de gestação dos grupos CT + 2 horas (5b) e CY + 2 horas (5c). Fotomicrografia dos sítios de implantação do décimo dia de gestação com coloração em Hematoxilina e Eosina dos grupos CT + 2 horas (5d) e CY + 2 horas (5e). Aumento de 4x. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

Os úteros dos animais tratados com ciclofosfamida por 48 horas, apesar de terem visíveis os seus sítios de implantação, eles eram hemorrágicos e em aparente reabsorção (6d), ao contrário do grupo CT + 48 horas que apresentavam características normais para o dia de gestação (6c). A análise morfológica dos sítios de implantação mostrou que, enquanto os sítios do grupo CT + 48 horas possuíam características morfológicas esperadas para o dia gestacional (Figura 6e), os sítios de implantação dos animais do grupo CT + 48 horas (6f) possuíam características de reabsorção como a reepitelização luminal do sítio com aumento de glândulas uterinas na região antimesometrial, hemorragia intensa com infiltrado de neutrófilos (6g e 6h), núcleos picnóticos indicativos de apoptose (6i) podendo ser observado até mesmo sítios com grande desorganização estrutural e com avançado processo de reepitelização, hemorragia e infiltrado leucocitário, onde predominavam os neutrófilos (6j). Portanto, o grau de reabsorção embrionária nos sítios de implantação foi variável, ou seja, puderam ser observados desde sítios com hemorragia em

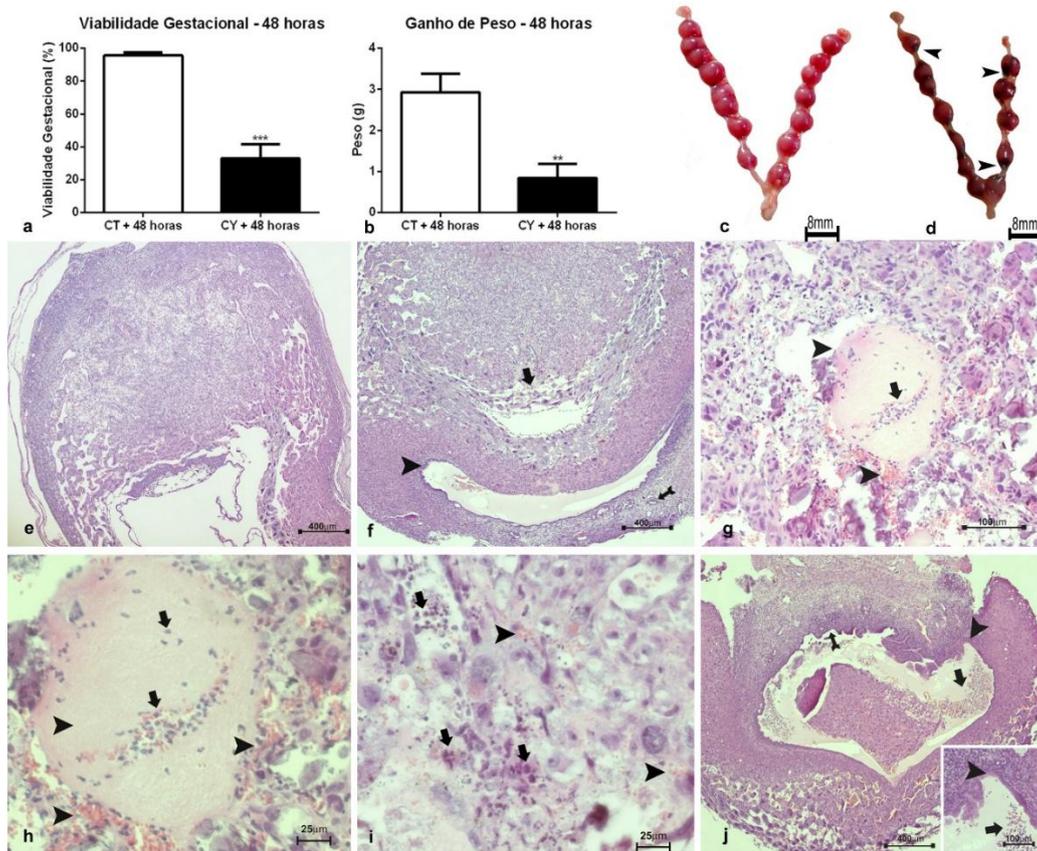
aspecto inicial, infiltrado de leucócitos e reepitelização (6f) até sítios que aparentavam estar em estágios avançados de reabsorção embrionária (6j).

A análise da viabilidade gestacional a termo mostrou que, quando a ciclofosfamida é administrada tanto no 8ºddg (Figura 7) quanto no 10ºddg (Figura 8), na dose de 40mg/kg, ocorre 100% de perdas gestacionais. No grupo onde a ciclofosfamida foi administrada no 8ºddg e a viabilidade gestacional avaliada no 21ºddg, o ganho de peso dos animais tratados com a ciclofosfamida foi significativamente menor ($4,66\text{g} \pm 1,089$) quando comparado com o controle ($21,91 \pm 4,168$) ($p=0,0039$) (Figura 7a). Nesse grupo o tratamento inviabilizou a gestação com nenhum nascimento registrado (Figura 7b e 7c). Já o grupo controle, com administração do soro fisiológico 0,9% no 8ºddg, o número de filhotes foi de $8,8 \pm 2,8$ (Figura 7b), com um número de fetos nascidos vivos de $8,6 \pm 2,657$ (Figura 7c), com média de peso dos fetos de $1,836\text{g} \pm 0,092$ (Figura 7d) e tamanho dos fetos de $4,626\text{cm} \pm 0,127$ (Figura 7e). Não foram observadas má formações (Figura 7f). Foi possível observar que o útero dos animais tratados com ciclofosfamida no 8ºddg eram pequenos, menores que aqueles característicos para o 10ºddg, sendo possível observar locais de implantação embrionária em nítida reabsorção (Figura 7g).

No grupo onde a ciclofosfamida foi administrada no décimo dia de gestação e a viabilidade gestacional avaliada no 21ºddg, o grupo tratado com ciclofosfamida teve redução do peso do décimo ao vigésimo primeiro dia de gestação ($-1,236\text{g} \pm 0,9406$), enquanto a média do ganho de peso dos animais controle foi de $21,91 \pm 1,371$ ($p<0,0001$) (Figura 8a). Nenhum nascimento foi registrado nos animais tratados com a ciclofosfamida no 10ºddg (Figura 8b).

O número de nascimentos registrados no grupo controle foi de $11 \pm 0,9487$ (Figura 8b), com média de nascidos vivos de $10,6 \pm 0,7483$ (Figura 8c), peso dos fetos de $1,875\text{g} \pm 0,07111$ (Figura 8d) e tamanho dos fetos em $4,583\text{cm} \pm 0,09516$ (Figura 8e). Nenhum feto mostrou má formações (8f). O útero dos animais tratados com ciclofosfamida no 10ºddg mostrava nitidamente os sítios em reabsorção (Figura 8g).

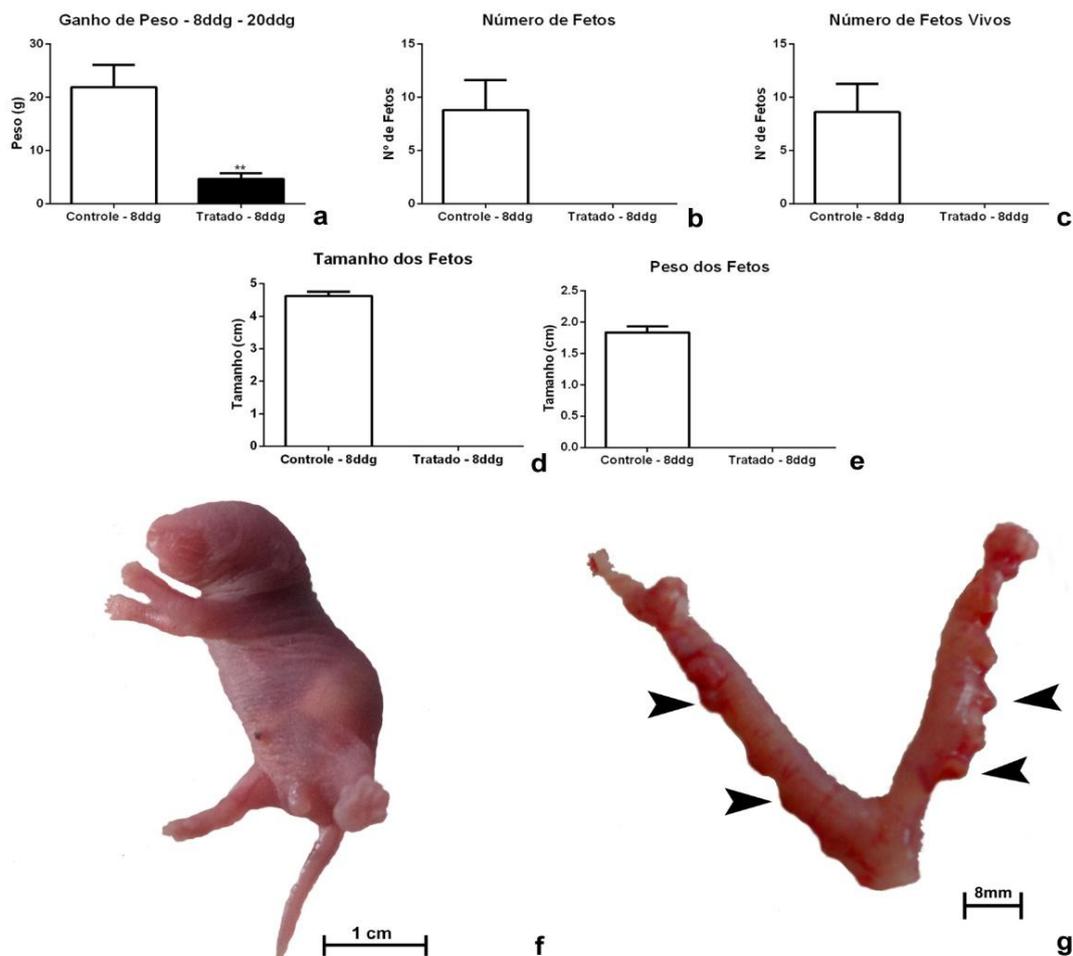
Figura 6 – Análise da Viabilidade Gestacional – Grupos 48 horas



Nota: Análise da taxa de viabilidade gestacional (6a) e ganho de peso do 8ºddg ao 10ºddg (6b). Análise macroscópica dos sítios de implantação no décimo dia de gestação dos grupos CT + 48 horas (6c) e CY + 48 horas (6d). Fotomicrografias de sítios de implantação do décimo dia de gestação com coloração em Hematoxilina e Eosina dos grupos CT + 48 horas (6e) e do grupo CY + 48 horas (6f – 6j). Fotomicrografia mostrando a hemorragia (cabeça de seta) e infiltrado de neutrófilos (seta) (6g). Detalhe do nódulo hemorrágico mostrado em 6g (cabeças de seta) e infiltrado de neutrófilos (seta) (6h). Detalhe da desorganização tecidual mostrando núcleos picnóticos (setas) e eritrócitos no interior de células trofoblásticas gigantes (cabeças de setas) (6i). Sítio de implantação em estágio avançado de reabsorção, com desorganização estrutural, glândulas uterinas (flecha), reepitelização (cabeça de seta) e grande nódulo hemorrágico com infiltrado de leucocitário onde predominavam neutrófilos (seta). Detalhe da reepitelização (cabeças de seta) e infiltrado leucocitário (seta) abaixo a direita em 6j. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

Figura 7 – Análise da Viabilidade Gestacional a Termo – Grupos 8ºddg



Nota: Análise da Viabilidade Gestacional a termo (Grupos 8ºddg). Ganho de peso (7a), número de fetos (7b), número de fetos nascidos vivos (7c), tamanho dos fetos (7d) e peso dos fetos (7e). Feto (grupo controle) (7f) e útero (grupo tratado) (7g). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

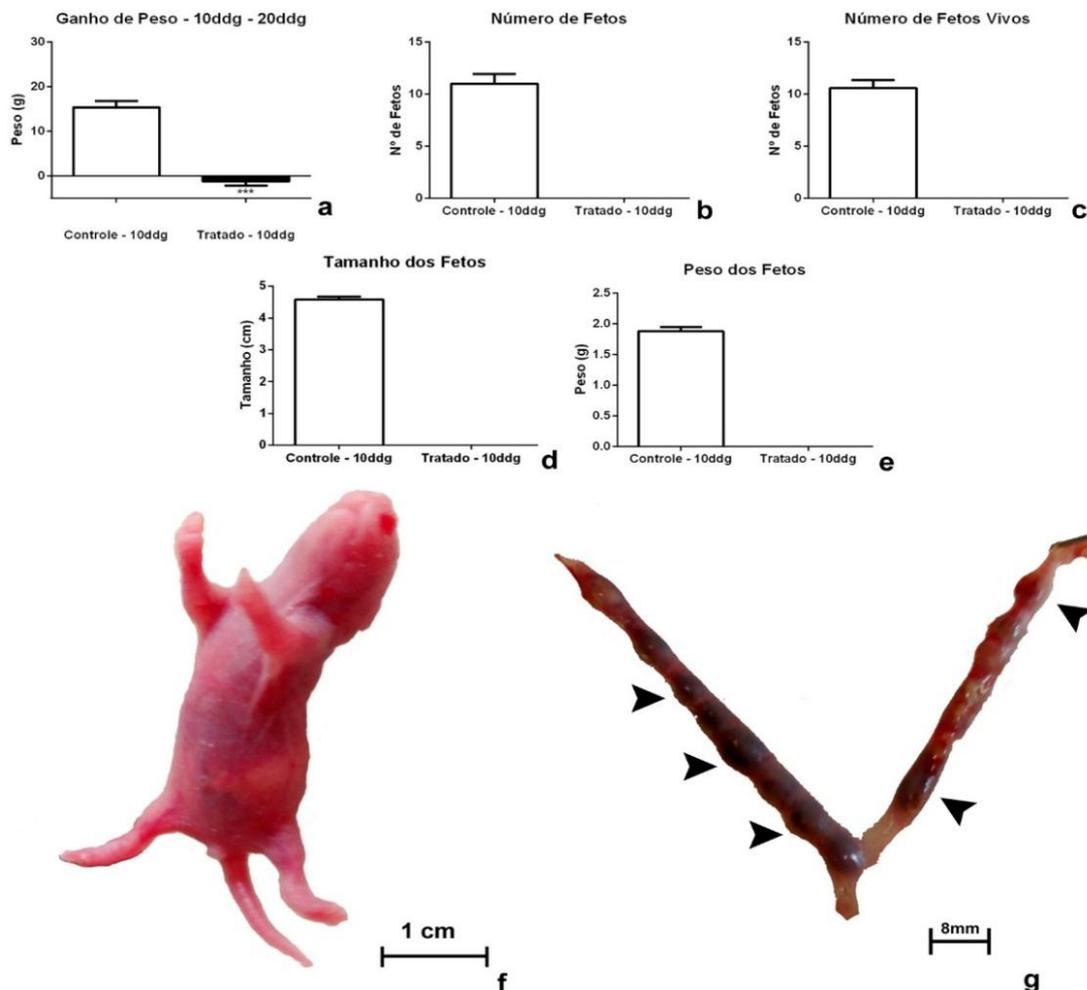
Fonte: do autor.

6.3 Análise morfológica

Na análise morfológica dos cortes histológicos submetidos ao procedimento de citoquímica com lectina DBA obtidos de sítios de implantação no décimo dia de gestação tanto de animais tratados com ciclofosfamida por 1, 2 e 48 horas (CY + 1 hora, CY + 2 horas e CY + 48 horas) (40mg/kg) como de animais não tratados (CT + 1 hora, CT + 2 horas e CT + 48 horas) (Figura 9), foi possível observar que as células uNK eram fortemente reativas à lectina DBA nos sítios de implantação na região mesometrial (Figura 9a), reação esta que

não ocorreu no controle negativo (Figura 9b) e as células mostravam reação tanto em região de membrana quanto nos grânulos citoplasmáticos (Figura 9c).

Figura 8 – Análise da Viabilidade Gestacional a Termo – Grupos 10^oddg



Nota: Análise da Viabilidade Gestacional a termo (Grupos 10^oddg). Ganho de peso (8a), número de fetos (8b), número de fetos nascidos vivos (8c), tamanho dos fetos (8d) e peso dos fetos (8e). Feto (grupo controle) (8f) e útero (grupo tratado) (8g). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

Foi possível também identificar os 4 subtipos de células Natural Killer Uterinas, assim como descrito por Paffaro JR e colaboradores (2003). Sendo assim, o subtipo 1 tinha tamanho pequeno, aspecto linfóide, área de membrana fortemente reativa e ausência de grânulos reativos à lectina DBA, formato esférico com núcleo circular contendo predominantemente heterocromatina (Figura 9d). O subtipo 2 possuía tamanho maior que o subtipo 1 e continha poucos grânulos citoplasmáticos reativos à lectina DBA, e seu núcleo ainda

continha grandes áreas com heterocromatina (Figura 3e). Já o subtipo 3, foi observado como célula de aspecto maduro, possuindo muitos grânulos citoplasmáticos fortemente reativos à lectina DBA, diâmetro maior que os subtipos 1 e 2, com núcleo contendo, predominantemente, eucromatina e nucléolo evidente (Figura 9f). O subtipo 4, por sua vez, possuía características que sugeriam sua senescência, como a presença de vacúolos celulares (indicando extração celular), conteúdo granular variável, diâmetro grande e núcleo contendo eucromatina (Figura 9g). Em animais tratados com ciclofosfamida, foi possível observar alterações na reatividade das células Natural Killer Uterinas frente à citoquímica com lectina DBA, não sendo possível classifica-las em nenhum dos 4 subtipos descritos por Paffaro Júnior e colaboradores (2003), sendo então classificadas num quinto subtipo, denominado de células uNK alteradas (Figura 9h). Estas células apresentavam descontinuidade na marcação de região de membrana, assim como grânulos com aspecto vazio ou grânulos não marcados com lectina DBA (Figura 9i), assim como descrito por Lippe (2007) e Zavan (2011).

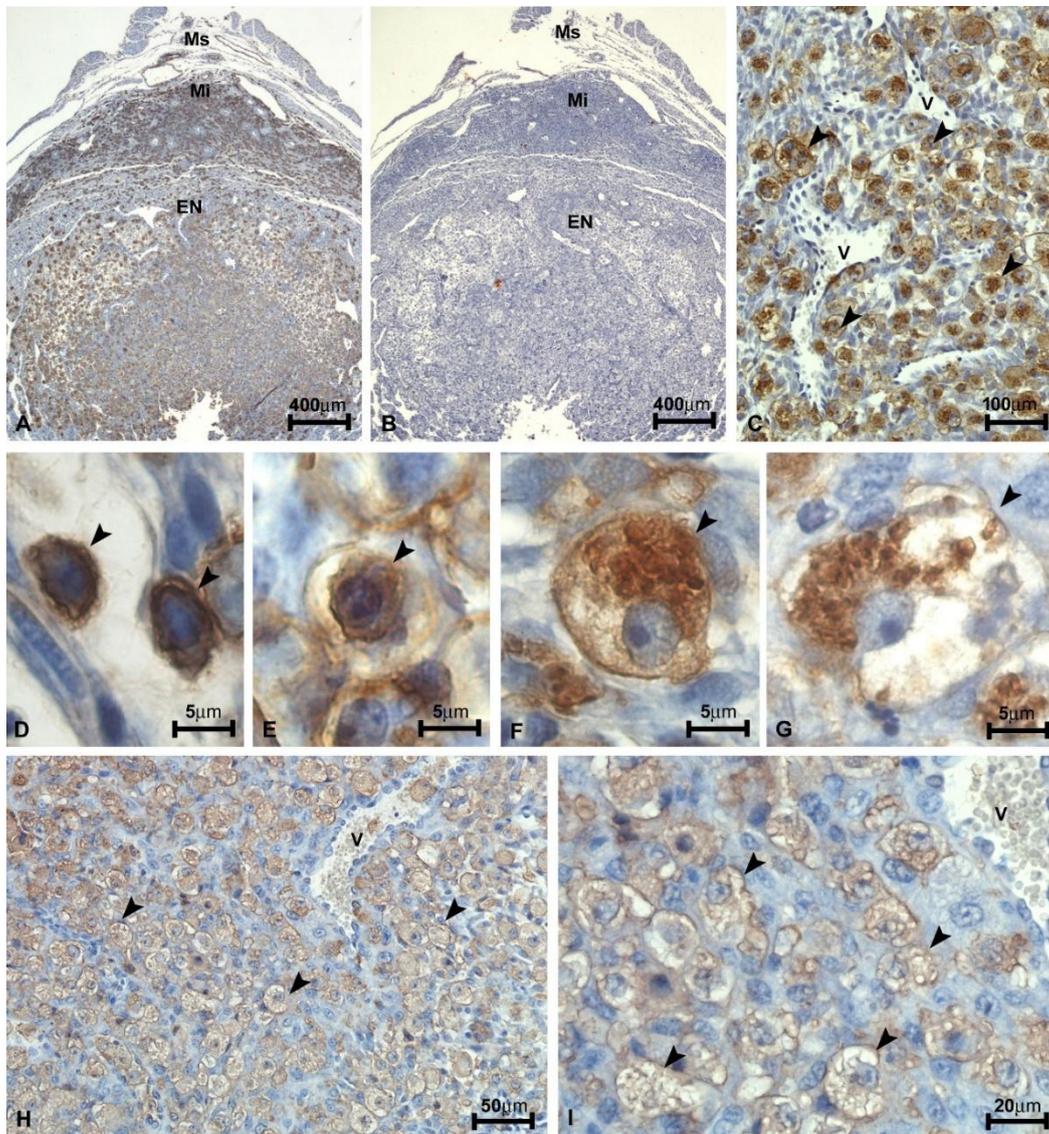
6.4 Estudo Estereológico

O estudo estereológico mostrou que houve um aumento no total de células DBA⁺ no grupo tratado com ciclofosfamida por 1 hora (CY + 1 hora) ($87,13 \pm 4,63$) quando comparado com o grupo não tratado de 1 hora (CT + 1 hora) ($69,71 \pm 2,846$) ($p=0,0125$) (Figura 10a). Não houve diferenças estatísticas significativas no total de células entre o grupo tratado com ciclofosfamida por 2 horas (CY + 2 horas) ($77,16 \pm 2,885$) e seu respectivo controle (CT + 2 horas) ($65,02 \pm 5,273$) ($p=0,0782$) (Figura 10b). Já nos grupos 48 horas, houve uma redução no número de células no grupo CY + 48 horas ($49,96 \pm 2,548$) quando comparado com o grupo CT + 48 horas ($70,49 \pm 3,685$) ($p=0,0018$) (Figura 10c).

Na análise estereológica por região, a diferença no número total de células DBA⁺ na região 1 do grupo CY + 1 hora ($41,78 \pm 3,486$) e do grupo CT + 1 hora ($33,42 \pm 1,356$) não foi estatisticamente relevante ($p=0,056$) (Figura 10d) assim

como nas diferenças na região 2 entre os grupos CY + 1 hora ($21,36 \pm 1,799$) e o grupo CT + 1 hora ($18,51 \pm 1,281$) ($p=0,2337$) (Figura 10e).

Figura 9 – Análise morfológica com citoquímica de lectina DBA



Nota: Região mesometrial de sítios de implantação de décimo dia de gestação (3a). Controle negativo da citoquímica com lectina DBA (3b). Células Natural Killer Uterinas marcadas com lectina DBA (cabeça de seta) (3c). Subtipos 1 (3d), 2 (3e), 3 (3f) e 4 (3g). Região mesometrial de sítios de implantação de animais tratados com ciclofosfamida por 1 hora com alterações na reatividade à lectina DBA (cabeça de seta) (3h) e em animais tratados com ciclofosfamida por duas horas (3i). Ms. Mesometrial, Mi. Miométrio, En. Endométrio, V. Vaso. DAB-peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

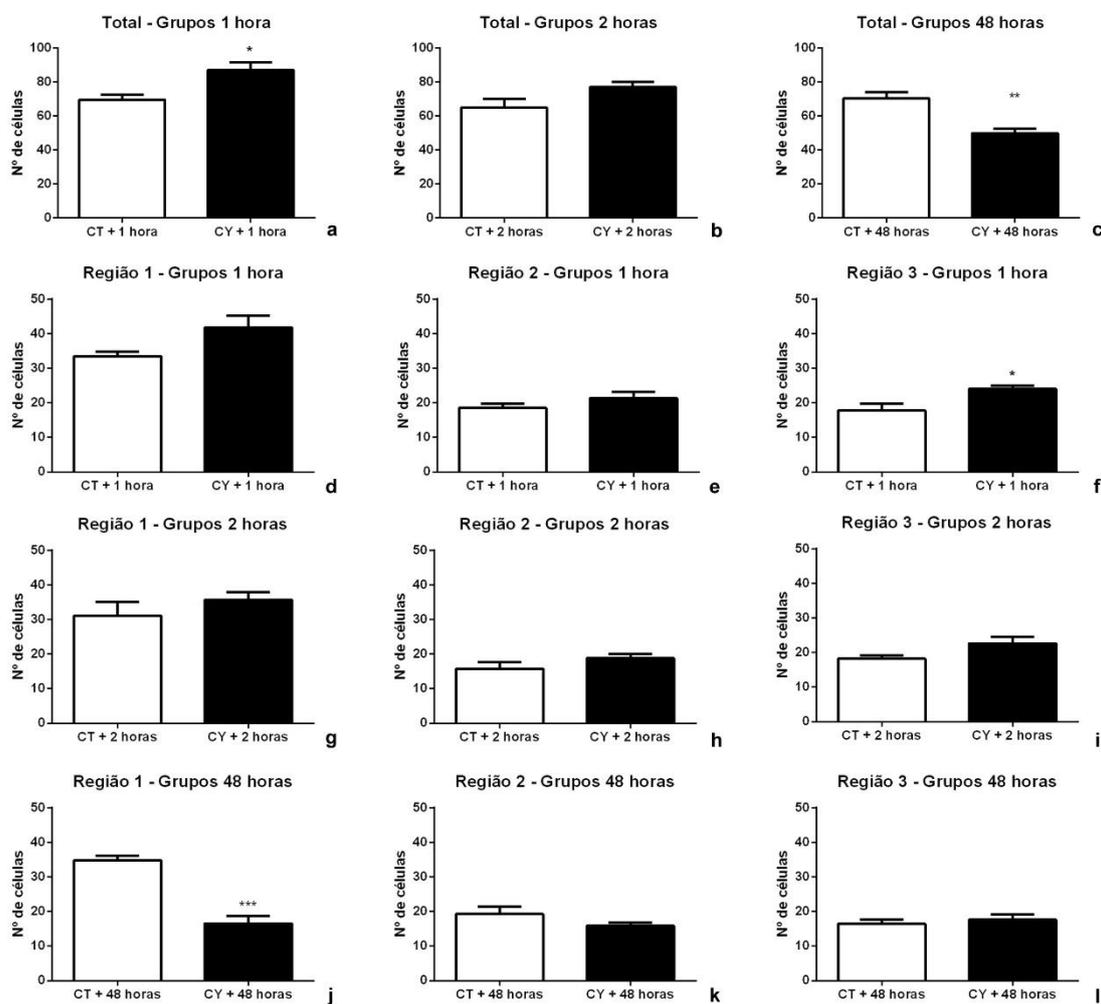
No entanto, na região 3, o número de células DBA⁺ no grupo CY + 1 hora ($24 \pm 0,9901$) foi maior que o grupo CT + 1 hora ($17,78 \pm 1,919$) ($p=0,0205$) (Figura 10f). Não houve diferenças significativas entre o número de células, por região, entre os CY + 2 horas e CT + 2 horas em nenhuma das três regiões. Na

região 1, o número total de células no grupo CT + 2 horas foi de $31,09 \pm 4,035$ enquanto no grupo CY + 2 horas foi de $35,69 \pm 2,277$ ($p=0,3499$) (Figura 10g). Na região 2, o número de células no grupo CT + 2 horas foi de $15,73 \pm 1,867$ e no grupo CY + 2 horas foi de $18,82 \pm 1,267$ ($p=0,2081$) (Figura 10h). Já na região 3, o número de células uNK DBA⁺ no grupo CT + 2 horas foi de $18,20 \pm 0,9023$ enquanto no grupo CY + 2 horas foi de $22,64 \pm 1,938$ ($p=0,0713$) (Figura 10i). Nos grupos 48 horas, houve uma redução de células na região 1 no grupo CY + 48 horas ($16,53 \pm 2,187$) quando comparado com o grupo CT + 48 horas ($34,82 \pm 1,270$) ($p<0,0001$) (Figura 10j). Nas demais regiões, não houve diferença estatisticamente significativa. Na região 2, o número de células do grupo CT + 48 horas foi de $19,22 \pm 2,11$ enquanto no grupo CY + 48 horas este número foi de $15,80 \pm 0,9319$ ($p=0,1762$) (Figura 10j). Na região 3, enquanto o número de células no grupo CT + 48 horas foi de $16,44 \pm 1,170$, o número de células no grupo CY + 48 horas foi de $17,62 \pm 1,488$ ($p=0,5511$).

Quando comparamos os grupos tratados quanto ao número total de células uNK DBA⁺ (Figura 11a), podemos notar que não houve diferenças significativas entre os grupos CY + 1 hora ($87,13 \pm 4,633$) quando comparado com o grupo CY + 2 horas ($77,16 \pm 2,885$) ($p=0,1049$). Porém, houve uma redução significativa no número de células no grupo CY + 48 horas ($49,96 \pm 2,548$) quando comparado com os outros dois grupos tratados ($p<0,0001$). De maneira semelhante, ao analisarmos o total de células na região 1 entre os grupos tratados com ciclofosfamida (Figura 11b), podemos perceber que novamente não houve diferenças entre os grupos CY + 1 hora ($41,78 \pm 3,486$) e o grupo CY + 2 horas ($35,69 \pm 2,277$) ($p=0,1819$) mas houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo CY + 48 horas ($16,53 \pm 2,187$) quando comparados com os outros dois grupos tratados com ciclofosfamida ($p<0,0001$).

Já quando comparamos o número de células na região 2 (Figura 11c), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CY + 1 hora ($21,36 \pm 1,799$) e CY + 2 horas ($18,82 \pm 1,267$) ($p=0,2828$) nem deste último grupo com o grupo CY + 48 horas ($15,80 \pm 0,9319$) ($p=0,0909$). Porém, houve uma redução significativa quando comparamos o grupo CY + 48 horas ($15,80 \pm 0,9319$) com o grupo CY + 1 hora ($21,36 \pm 1,799$) ($p=0,0449$).

Figura 10 – Estudo estereológico – número de uNK total e por regiões dos sítios de implantação

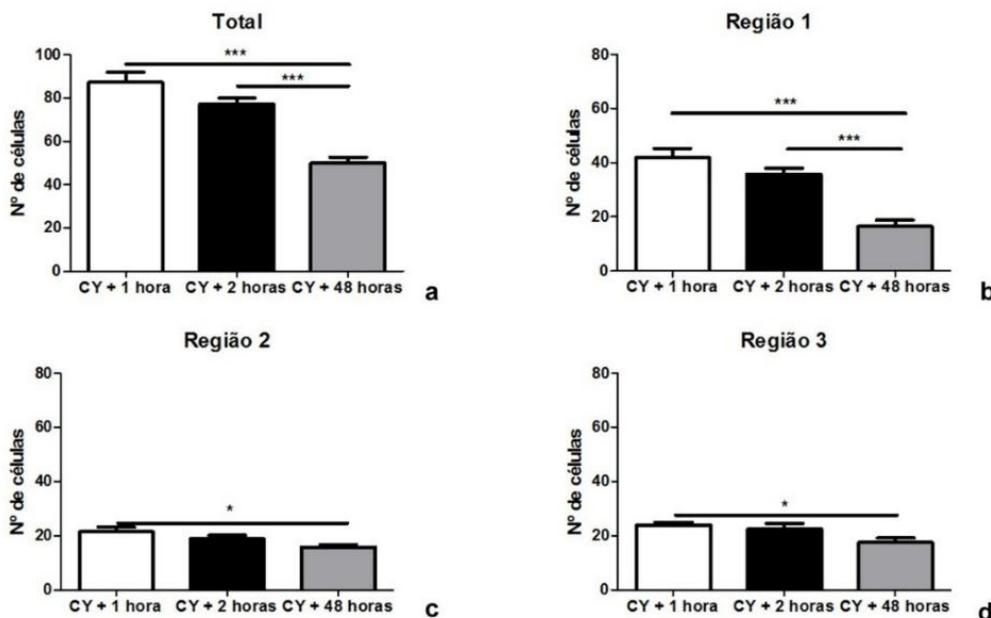


Nota: Total de células uNK nos grupos 1 hora (10a), 2 horas (10b) e 48 horas (10c). Total de células uNK por região dos grupos 1 hora – região 1 (10d), região 2 (10e) e região 3 (10f). Total de células uNK por região dos grupos 2 horas – região 1 (10g), região 2 (10h) e região 3 (10i). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Fonte: do autor.

Por fim, se compararmos o número de células na região 3 (Figura 11d), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CY + 1 hora ($24 \pm 0,9901$) e CY + 2 horas ($22,64 \pm 1,938$) ($p=0,5508$) nem deste último grupo com o grupo CY + 48 horas ($17,62 \pm 1,488$) ($p=0,0739$). Porém, houve uma redução significativa quando comparamos o grupo CY + 48 horas ($17,62 \pm 1,488$) com o grupo CY + 1 hora ($24 \pm 0,990$) ($p=0,0283$).

Figura 11 – Estudo estereológico – comparação entre grupos tratados



Nota: Total de células uNK nos grupos tratados com ciclofosfamida por 1, 2 e 48 horas (11a). Total de células uNK nos grupos tratados com ciclofosfamida por 1, 2 e 48 horas na região 1 (11b), região 2 (11c) e região 3 (11d). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).
Fonte: do autor.

A contagem dos 4 subtipos de uNK por região (Figura 12) mostrou que na região do miométrio e no endométrio que fica próximo ao miométrio (região 1), não houve diferenças estatisticamente significativas na contagem do subtipo 1 entre os grupos CT + 1 hora (5,4/AT) e o grupo CY + 1 hora (3,444/AT) ($p=0,1472$) (Figura 12a), assim como no subtipo 3 entre os grupos CT + 1 hora (6,778/AT) e o grupo CY + 1 hora (5,133 /AT) ($p=0,4870$) (Figura 12g) e no subtipo 4 entre os grupos CT + 1 hora (0,08/AT) e o grupo CY + 1 hora (1,333/AT) ($p=0,2457$) (Figura 12j). Porém, houve uma redução de células do subtipo 2 no grupo CY + 1 hora (10,64/AT) quando comparado com o grupo CT + 1 hora (16,56/AT) ($p=0,0292$) (Figura 12d) assim como um aumento de células do subtipo alteradas no grupo CY + 1 hora (21,22/AT) quando comparado com o grupo CT + 1 hora (4,4/AT) ($p=0,0029$) (Figura 12m).

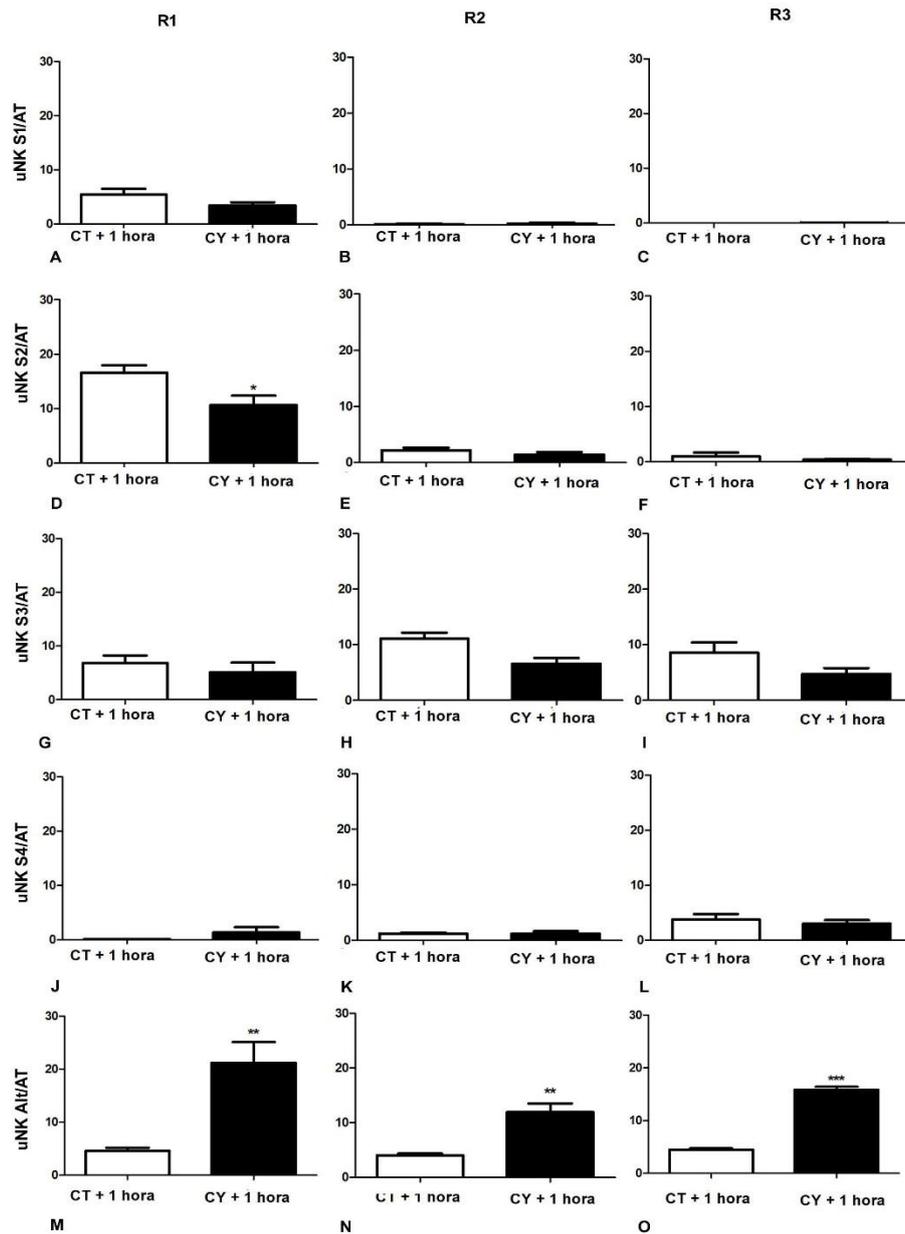
Na região intermediária entre o miométrio e o endométrio decidualizado localizado próximo à região de interação materno-fetal (Região 2), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no subtipo 1 entre os grupos CT + 1 hora (0,133/AT) e o grupo CY + 1 hora (0,244/AT) ($p=0,6623$) (Figura 12b), no subtipo 2 entre os grupos CT + 1 hora (2,156/AT) e o grupo CY

+ 1 hora (1,422/AT) ($p=0,2589$) (Figura 12e), no subtipo 3 entre os grupos CT + 1 hora (11,04/AT) e o grupo CY + 1 hora (6,6/AT) ($p=0,0556$) (Figura 12h) e no subtipo 4 entre os grupos CT + 1 hora (1,178/AT) e no grupo CY + 1 hora (1,178/AT) ($p=1$) (Figura 12k). No entanto, houve um aumento de células uNK do subtipo alteradas no grupo CY + 1 hora (11,91/AT) quando comparado com o grupo CT + 1 hora (4/AT) ($p=0,0013$) (Figura 12n).

Na região localizada mais próxima do embrião em desenvolvimento (Região 3), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no subtipo 1 entre os grupos CT + 1 hora (0/AT) e o grupo CY + 1 hora (0/AT) ($p=1$) (Figura 12c), assim como no subtipo 2 entre os grupos CT + 1 hora (0,95/AT) e o grupo CY + 1 hora (0,31/AT) ($p=0,7503$) (Figura 12f), no subtipo 3 entre os grupos CT + 1 hora (8,53/AT) e o grupo CY + 1 hora (4,73/AT) ($p=0,1116$) (Figura 12i) e por fim o subtipo 4 entre os grupos CT + 1 hora (3,8/AT) e o grupo CY + 1 hora (3,04/AT) ($p=0,5327$) (Figura 12l). Em contrapartida, houve um significativo aumento de células uNK do subtipo alteradas na região 3 no grupo CY + 1 hora (15,87/AT) quando comparado com o grupo controle (4,48/AT) ($p<0,0001$) (Figura 12o).

Corroborando com os resultados obtidos na contagem dos subtipos de células uNK dos grupos CT + 1 hora e CY + 1 hora, a análise dos sítios de implantação submetidos à histoquímica com lectina DBA mostradas na figura 13, mostrou que a região 1 dos animais do grupo CT + 1 hora possuía uma população maior de células uNK do subtipo 2, mostrando células com poucos grânulos citoplasmáticos, assim como região de membrana fortemente reativa à lectina DBA⁺ (Figura 13a) enquanto a região 1 dos animais submetidos ao tratamento com ciclofosfamida por 1 hora (CY + 1 hora) mostrou um menor número de células uNK do subtipo 2 (Figura 13b).

Figura 12 – Análise Estereológica por subtipos dos grupos 1 hora

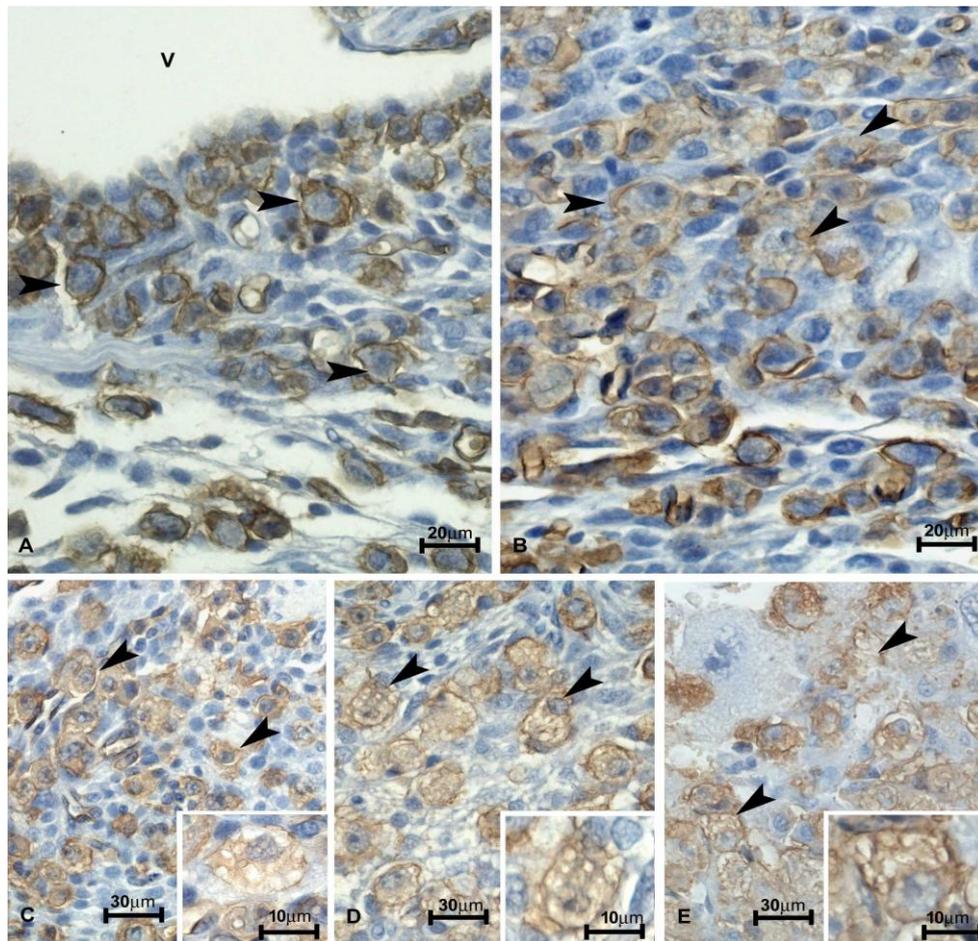


Nota: Distribuição de células uNK por área teste (AT = 200µm x 200 µm) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas do grupo controle + 1 hora (CT + 1 hora) e do grupo ciclofosfamida + 1 hora (CY + 1 hora). Subtipo I (a-c), Subtipo II (d-f), Subtipo III (g-i), Subtipo IV (j-l) e Subtipo Alteradas (m-o). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

A região 1 dos animais submetidos ao tratamento com ciclofosfamida por 1 hora mostrou um aumento significativo de células uNK do subtipo alteradas, com alteração no padrão de reatividade à lectina DBA, como descontinuidade de marcação e/ou presença de grânulos não reativos e com aspecto vazio (figura 13c). Isso também foi observado na região 2 (Figura 13d) e na região 3 (Figura 13e).

Figura 13 – Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 1 hora



Nota: Predomínio de células uNK do subtipo II (cabeça de seta) em região 1 em animais do grupo CT + 1 hora (a) contrapondo-se a um número menor de células uNK do subtipo II em animais do grupo CY + 1 hora (b). Alta incidência de células uNK do subtipo alteradas (cabeças de seta) nas regiões 1 (c), 2 (d) e 3 (e) em animais do grupo CY + 1 hora. V. Vaso. DAB-peroxidase e Hematoxilina.

Nos grupos tratados por duas horas (CT + 2 horas e CY + 2 horas), a análise estereológica dos 4 subtipos por região mostrou que na região 1 não houve diferenças estatisticamente significativas no subtipo 1 entre os grupos CT + 2 horas (5,933/AT) e o grupo CY + 2 horas (4,578/AT) ($p=0,4193$) (Figura 14a), assim como no subtipo 2 entre os grupos CT + 2 horas (20,58/AT) e o grupo CY + 2 horas (15,20/AT) ($p=0,233$) (Figura 14d), no subtipo 3 entre os grupos CT + 2 horas (3,4/AT) e o grupo CY + 2 horas (3,867/AT) ($p=0,7533$) (Figura 14g) e por fim no subtipo 4 entre os grupos CT + 2 horas (0,1111/AT) e o grupo CY + 2 horas (0,08889/AT) ($p=0,7707$) (Figura 14j). Entretanto, no subtipo alteradas, houve um significativo aumento de células no grupo CY + 2 horas (11,96/AT)

quando comparado com o grupo CT + 2 horas (1,067/AT) ($p=0,0079$) (Figura 14m).

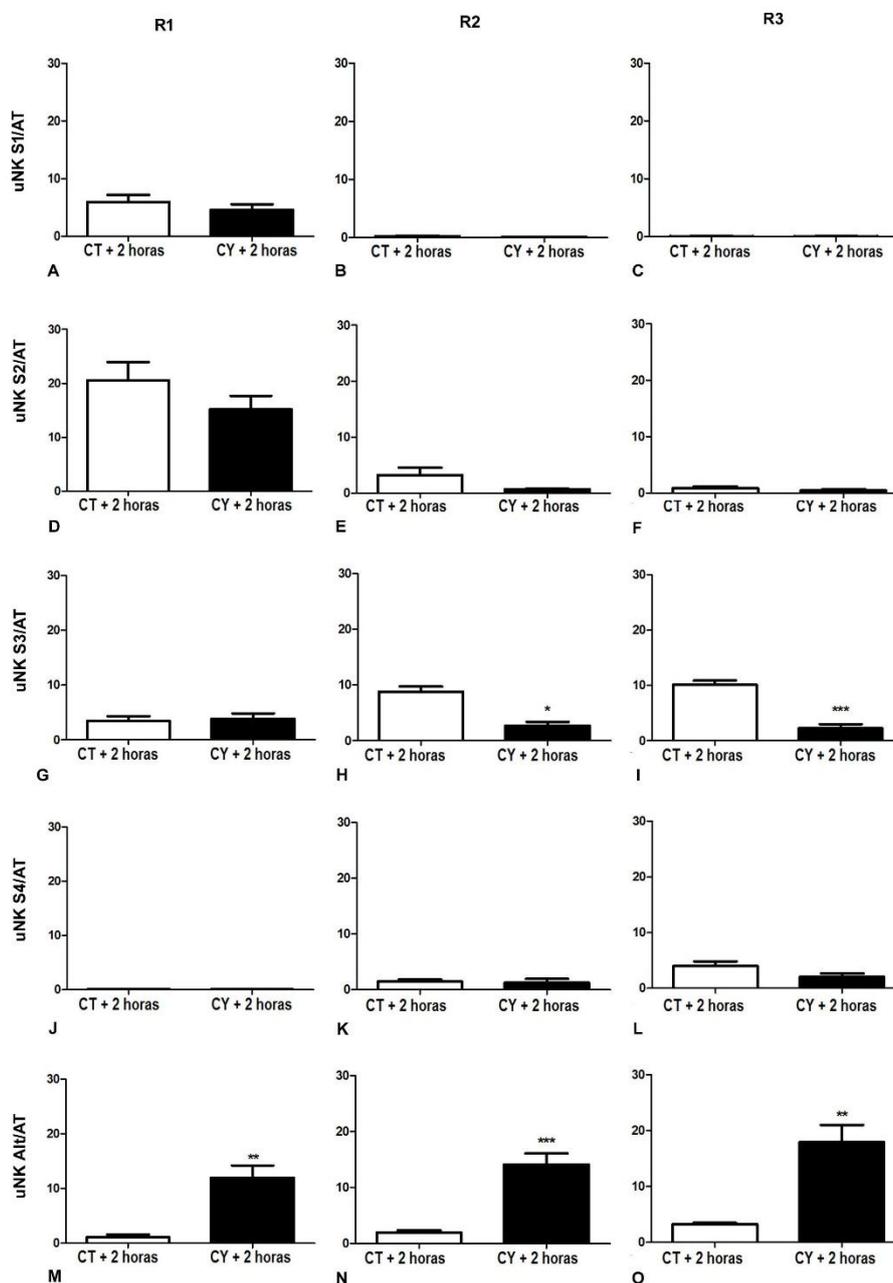
Já na região intermediária entre o endométrio e o embrião, a região 2, não houve diferenças estatísticas significativas na contagem do subtipo 1 entre os grupos CT + 2 horas (0,2222/AT) e o grupo CY + 2 horas (0,08889/AT) ($p=0,2731$) (Figura 14b), assim como no subtipo 2 entre os grupos CT + 2 horas (3,244/AT) e o grupo CY + 2 horas (0,6889/AT) ($p=0,0826$) (Figura 14e) e por fim o subtipo 4 entre os grupos CT + 2 horas (1,467/AT) e o grupo CY + 2 horas (1,244/AT) ($p=0,6004$) (Figura 14k). No entanto, houve uma significativa redução do número de células do subtipo 3 no grupo CY + 2 horas (2,689/AT) quando comparado com o grupo CT + 2 horas (8,822/AT) ($p=0,0119$) (Figura 14h) acompanhado pelo aumento de células do subtipo alteradas no grupo CY + 2 horas (14,11/AT) quando comparado com o grupo CT + 2 horas (1,978/AT) ($p=0,0003$) (Figura 14n).

Na região mais próxima ao embrião, a região 3, resultados semelhantes à região 2 foram obtidos, onde não houve alterações estatísticas significativas no subtipo 1 entre os grupos CT + 2 horas (0,04444/AT) e o grupo CY + 2 horas (0,04444/AT) ($p=0,8808$) (Figura 14c), assim como no subtipo 2 entre os grupos CT + 2 horas (0,8888/AT) e o grupo CY + 2 horas (0,4444/AT) ($p=0,25$) (Figura 14f), e por fim o subtipo 4 entre os grupos CT + 2 horas (3,933/AT) e o grupo CY + 2 horas (2,022/AT) ($p=0,1128$) (Figura 14l). Porém, houve uma significativa redução no número de células do subtipo 3 no grupo CY + 2 horas (2,222/AT) quando comparado com o grupo CT + 2 horas (10,09/AT) ($p<0,0001$) (Figura 14i) acompanhado pelo aumento de células do subtipo alteradas no grupo CY + 2 horas (17,91/AT) comparado com o grupo CT + 2 horas (3,244/AT) ($p=0,0016$) (Figura 14o).

Comprovando os resultados obtidos na contagem dos subtipos de células uNK dos grupos CT + 2 horas e CY + 2 horas, a análise dos sítios de implantação submetidos à lectina DBA (Figura 15) revelou que nas regiões 2 e 3 dos animais do grupo CT + 2 horas mostraram maior número de células do subtipo 3, com seus grânulos e região de membrana fortemente reativos à lectina DBA (Figuras 15a e 15c) enquanto as regiões 2 e 3 dos animais do grupo CY + 2 horas

apresentavam uma significativa redução desta subpopulação celular (Figuras 15b e 15d).

Figura 14 – Análise Estereológica por subtipos dos grupos 2 horas



Nota: Distribuição de células uNK por área teste (AT = 200 μ m x 200 μ m) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas do grupo controle + 2 horas (CT + 2 horas) e do grupo ciclofosfamida + 2 horas (CY + 2 horas). Subtipo I (a-c), Subtipo II (d-f), Subtipo III (g-i), Subtipo IV (j-l) e Subtipo Alteradas (m-o). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

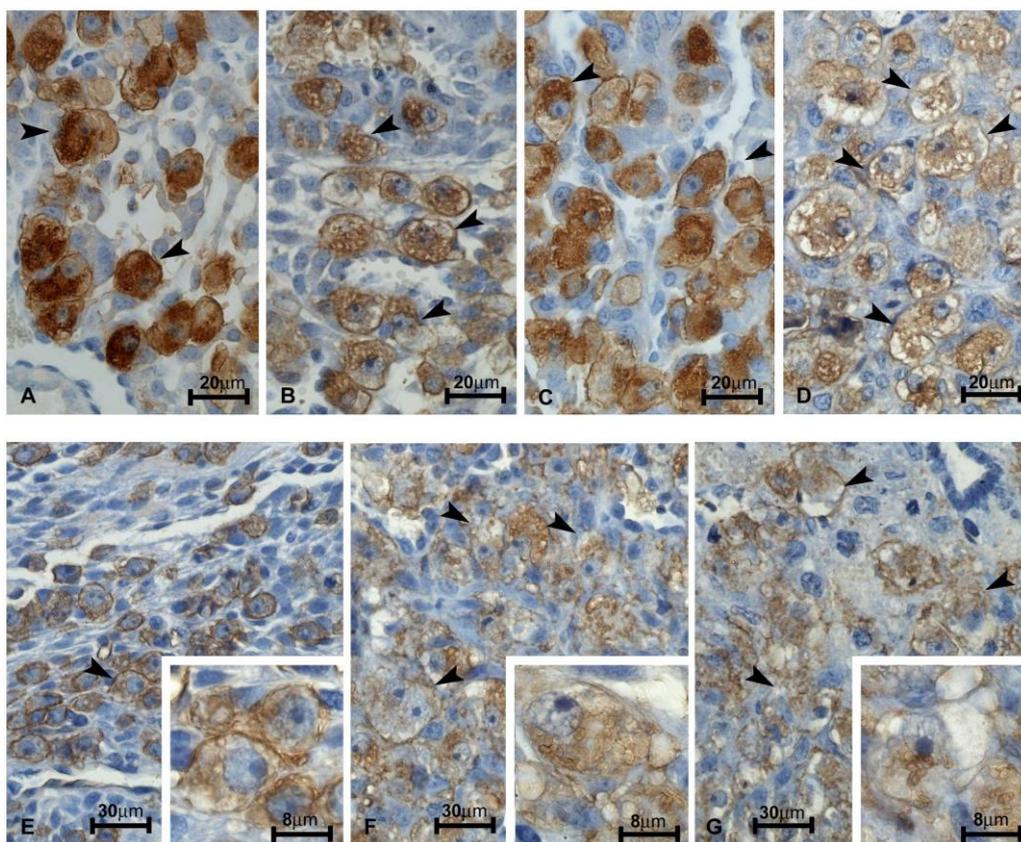
As regiões 1, 2 e 3 do grupo CY + 2 horas apresentaram um aumento de células com alterações no padrão de marcação, com descontinuidade em região de membrana e ausência de reatividade nos seus grânulos, as células do subtipo alteradas (Figura 15e, 15f e 15g).

A contagem dos subtipos de uNK por região mostrou que, na Região 1, apenas não houveram alterações na contagem do subtipo 4 entre os grupos CT + 48 horas (0,0666/AT) e CY + 48 horas (0,5555/AT) ($p=0,0867$) (Figura 16j). Foi possível observar uma redução de células do subtipo 1 no grupo CY + 48 horas (1,711/AT) quando comparado com o grupo CT + 48 horas (19,58/AT) ($p=0,0079$) (Figura 16a), assim como no subtipo 2 entre os grupos CY + 48 horas (1,956/AT) e CT + 48 horas (12,29/AT) ($p<0,0001$) (Figura 16d). Porém, houve um aumento de células do subtipo 3 no grupo CY + 48 horas (0,2444/AT) comparado com o grupo CT + 48 horas (1,444/AT) ($p=0,0480$) (Figura 16g), assim como no subtipo alterada no grupo CY + 48 horas (10,87/AT) e CT + 48 horas (2,644/AT) ($p=0,0014$) (Figura 16m).

Já na região 2 foi possível observar alterações entre os grupos em todos os subtipos. No subtipo 1, houve uma redução no número de células no grupo CY + 48 horas (0,2667/AT) comparado com o grupo CT + 48 horas (1,422/AT) ($p=0,0119$) (Figura 16b), assim como no subtipo 2 entre os grupos CY + 48 horas (0,4/AT) e CT + 48 horas (4,978/AT) ($p=0,0046$) (Figura 16e) e no subtipo 3 entre os grupos CY + 48 horas (2,089/AT) e CT + 48 horas (10,11/AT) ($p=0,0018$) (Figura 16h). No subtipo 4, houve um aumento no número de células do grupo CY + 48 horas (1,6/AT) quando comparado com o grupo CT + 48 horas (0,3556/AT) ($p=0,0381$) (Figura 16k), assim como no subtipo alteradas entre os grupos CY + 48 horas (11,44/AT) e CT + 48 horas (2,356/AT) ($p=0,0006$) (Figura 16n).

Na região 3, não houve diferenças estatisticamente significativas tanto no subtipo 1 entre os grupos CT + 48 horas (0,2/AT) e o grupo CY + 48 horas (0,2444/AT) ($p=0,7719$) (Figura 16c), assim como no subtipo 2 entre os grupos CT + 48 horas (0,8222/AT) e CY + 48 horas (0,2444/AT) ($p=0,1033$) (Figura 16f) e no subtipo 4 entre os grupos CT + 48 horas (3,8/AT) e o grupo CY + 48 horas (2,467/AT) ($p=0,0937$) (Figura 16l).

Figura 15 – Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 2 horas



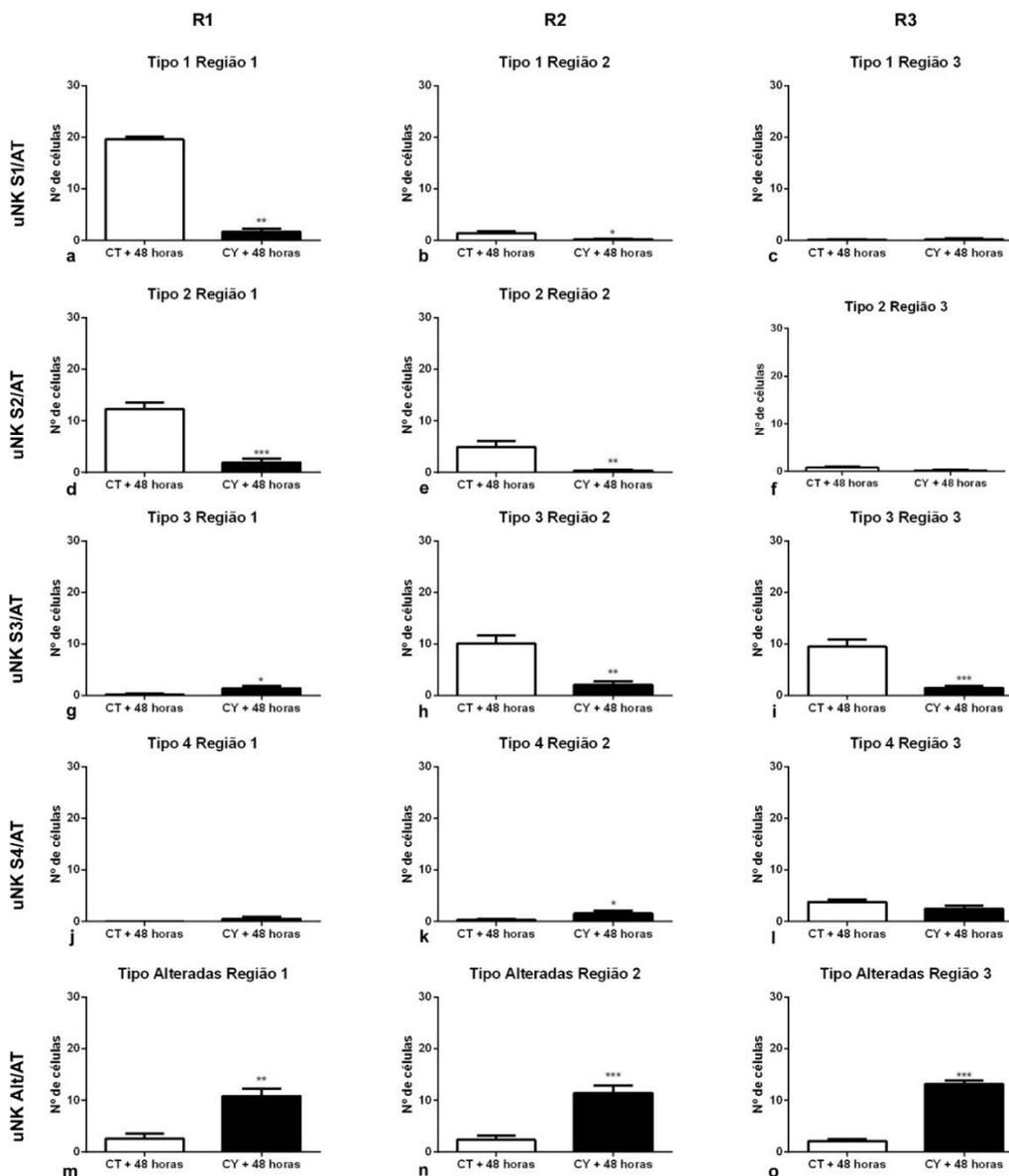
Nota: Predomínio de células uNK do subtipo III (cabeça de seta) em região 2 em animais do grupo CT + 2 horas (a) contrapondo-se a um número menor de células uNK do subtipo III em animais do grupo CY + 2 horas (b), assim como um predomínio de células uNK do subtipo III (cabeça de seta) em região 3 em animais do grupo CT + 2 horas (c) contrapondo-se a um número menor de células uNK do subtipo III em animais do grupo CY + 2 horas (d). Alta incidência de células uNK do subtipo alteradas (cabeças de seta) nas regiões 1 (e), 2 (f) e 3 (g) em animais do grupo CY + 2 horas. V. Vaso. DAB-peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Porém, houve uma redução significativa de células do subtipo 3 no grupo CY + 48 horas (1,467/AT) quando comparado com o grupo CT + 48 horas (9,511/AT) ($p=0,0007$) (Figura 16i) seguido pelo aumento de células do subtipo alteradas no grupo CY + 48 horas (13,2/AT) quando comparado com o grupo CT + 48 horas (2,111/AT) ($p<0,0001$) (Figura 16o).

A fim de comprovar os dados obtidos no estudo estereológico, a análise morfológica mostrou que em ambas as regiões há uma redução significativa de células dos subtipos 1, 2, 3 e 4 nas regiões 1, 2 e 3, assim como um aumento de células do subtipo alteradas nessas regiões (17b, 17d e 17f).

Figura 16 – Análise Estereológica por subtipos dos grupos 48 horas

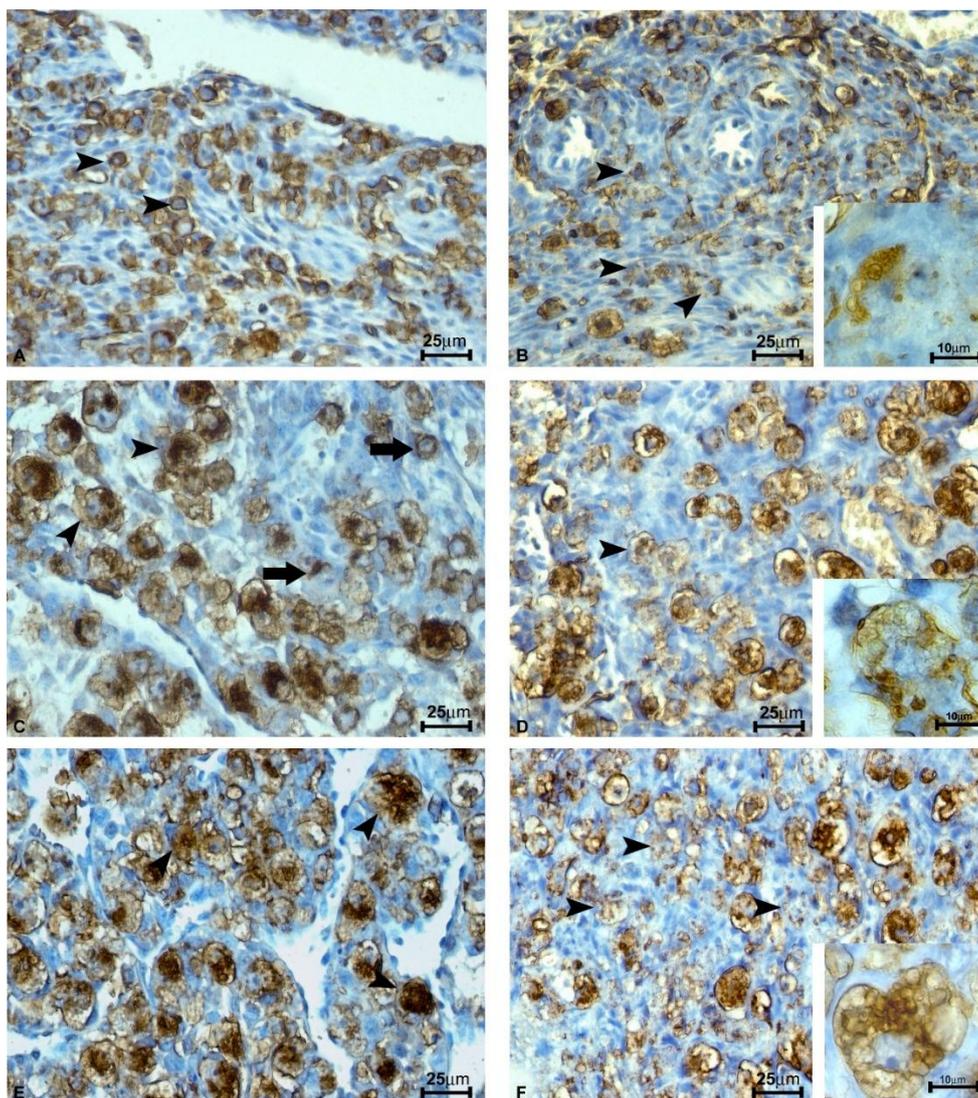


Nota: Distribuição de células uNK por área teste (AT = 200µm x 200 µm) durante a gestação nas regiões 1, 2 e 3 em fêmeas do grupo controle + 48 horas (CT + 48 horas) e do grupo ciclofosfamida + 48 horas (CY + 48 horas). Subtipo I (a-c), Subtipo II (d-f), Subtipo III (g-i), Subtipo IV (j-l) e Subtipo Alteradas (m-o). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Fonte: do autor.

Na região 1, podemos observar um número maior de células do subtipo 2 (Figura 17a), um número maior de células do subtipo 2 e 3 na região 2 (Figura 17c) e um número maior de células do subtipo 3 na região 3 (Figura 17e).

Figura 17 – Fotomicrografia dos sítios de implantação dos grupos 48 horas

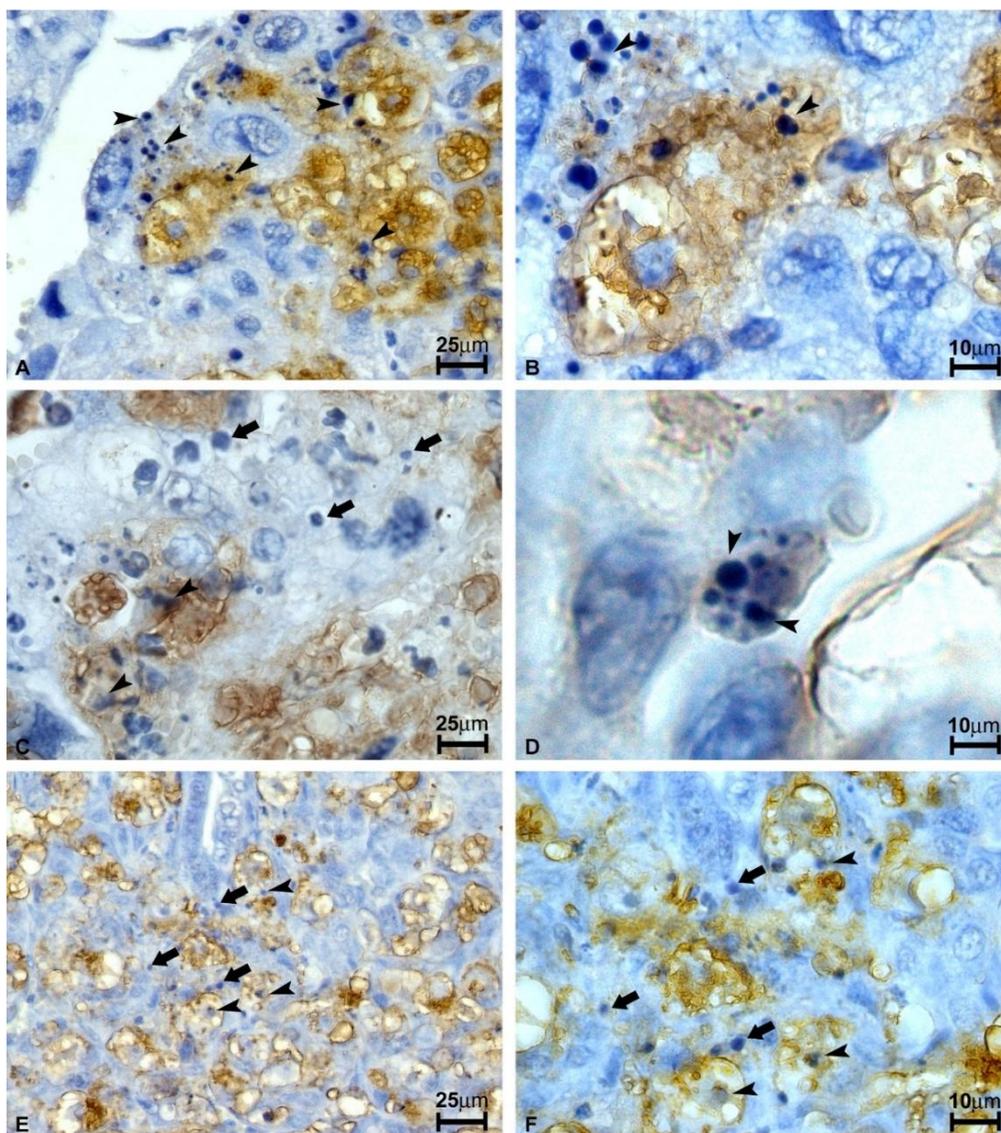


Nota: predomínio de células do subtipo 2 na região 1 (a), de células do subtipo 2 (seta) e 3 (cabeça de seta) na região 2 (c) e células do subtipo 3 na região 3 (e), assim como o predomínio de células do subtipo alteradas em todas as regiões (b, d, f). DAB-peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

Também foi possível observar nos animais tratados com ciclofosfamida por 1, 2 e 48 horas (Figura 18 (a-f)), a presença de corpos apoptóticos em células tanto DBA⁺ quanto em células DBA⁻, sugerindo fortemente a presença de células em apoptose nos sítios de implantação, principalmente na região 3.

Figura 18 – Fotomicrografia dos núcleos picnóticos de animais tratados com ciclofosdamida



Nota: presença de corpos apoptóticos em células não reativas à lectina DBA (seta) e em células reativas à lectina DBA (cabeça de seta). Grupo CY + 1 hora (A e B), CY + 2 horas (C e D) e CY + 48 horas (E e F). Notar a presença de células uNK alteradas em todos os grupos analisados. DAB-peroxidase e Hematoxilina.

Fonte: do autor.

7 DISCUSSÃO

A ciclofosfamida, droga sabidamente imunossupressora e antitumoral (GILANI e CHATZINOFF, 1983), vem sendo extensivamente estudada quanto aos seus efeitos teratogênicos e deletérios durante a gestação (SAVION et al., 2002). Os primeiros relatos do seu efeito teratogênico surgiram de estudos realizados por Gibson e Becker (1968), que utilizaram a ciclofosfamida em camundongos da linhagem SWISS, do 9º ao 14º dia de gestação, observando intensos efeitos teratogênicos a partir do 11º dia. A administração da droga no 9º e 10º dia de gestação, na concentração de 40mg/kg mostrou-se incompatível com a gestação, com taxas de perdas gestacionais de 100%. O foco atual dos pesquisadores é o estudo dos mecanismos que possam evitar os efeitos teratogênicos da ciclofosfamida quando o uso é indispensável durante a gestação, como a ativação do sistema imunológico através do uso da vacina BCG em associação com o extrato de *Ipopoea Carula* (LATORRE et al., 2007), assim como através da imunopotencialização uterina com esplenócitos de ratos da linhagem Wistar (SAVION et al., 2003) ou através do uso de chá verde, como mostrado por Longsdon e colaboradores (2012).

A gestação representa um momento imunológico único, onde dois genomas diferentes não produzem uma resposta negativa (CO et al., 2013). Uma vez que as células uNK atuam de maneira intensa na resposta imune durante a gestação (CROY et al., 2003b) e partindo do pressuposto que a ciclofosfamida é uma droga imunossupressora (OSTENSEN; FORGER, 2013), justifica-se o estudo dos efeitos da ciclofosfamida na incidência e comportamento das células uNK durante a gestação, uma vez que nunca um estudo assim foi conduzido. Do mesmo modo, nenhum estudo foi realizado afim de desvendar os efeitos comportamentais da ciclofosfamida em camundongos prenhes, quanto aos parâmetros de ansiedade e depressão. Porém, baseado nas evidências de que, concomitantemente às alterações morfológicas nas células uNK reativas à lectina DBA em camundongos da linhagem SWISS em animais que receberam doses de LPS ocorrem alterações comportamentais, tanto quanto à ansiedade e depressão (ZAVAN, 2011), os efeitos comportamentais da ciclofosfamida, em sua dose teratogênica (40mg/kg), foram no presente estudo avaliados.

Os resultados revelaram que, com 1 e 2 horas de tratamento, não foi possível observar alterações comportamentais tanto quanto aos parâmetros de ansiedade quanto aos de depressão. Já os animais tratados com ciclofosfamida por 48 horas mostraram comportamento ansiogênico e depressivo, com alterações de todos os parâmetros analisados, como o aumento seletivo da imobilidade no teste de suspensão pela cauda e a nítida preferência pela exploração dos braços fechados e redução da exploração e entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Steru e colaboradores (1985) descreveram que o aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda é um forte indicativo do comportamento depressivo, assim como o aumento na permanência nos braços fechados associado à redução na permanência nos braços abertos como indicadores do comportamento ansiogênico (LISTER, 1987; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Poucos estudos acerca dos efeitos da ciclofosfamida no comportamento de murinos foram realizados. As evidências apontam que a ciclofosfamida é capaz de reduzir a atividade espontânea assim como a redução na capacidade de aprendizado dos filhotes tanto da primeira quanto da segunda geração provenientes de cruzamentos onde o macho foi previamente tratado com a ciclofosfamida (AUROUX et al., 1990b). Essa redução na atividade espontânea e da capacidade de aprendizado pode ser explicada pela redução da atividade de norepinefrina no córtex fronto-parietal assim como na atividade da enzima acetilcolina-transferase no hipocampo nos filhotes de ambas as gerações e a explicação para tal fenômeno é a de que a ciclofosfamida foi capaz de alterar sequências de nucleotídeos em células germinativas do macho, assim como alterou a interação entre nucleoproteínas e o DNA, características essas transmitidas para a prole (AUROUX et al., 1990). Estudos realizados em camundongos deficientes em linfócitos T (nude) mostraram que a ciclofosfamida também foi capaz de reduzir a atividade espontânea no teste do campo aberto nessa linhagem. Os mesmos revelaram que os problemas cognitivos nesses animais estariam intimamente relacionados com o aumento da inflamação (CHRISTIE et al., 2012). Porém, com o passar do tempo de ação da droga, esses déficits comportamentais tendem a desaparecer, como mostrou Siegers e colaboradores (2015), onde 22 dias após a administração da ciclofosfamida em

camundongos da linhagem C56BL/6 não foi possível observar alterações tanto na atividade motora quanto na ansiedade, ambos parâmetros avaliados no teste do campo aberto.

Em humanos já foi possível observar alterações comportamentais em pacientes que fizeram uso da ciclofosfamida. 18,5% dos pacientes apresentaram depressão de moderada à grave. Uma possível explicação para o fenômeno é que o tempo insuficiente para a recuperação de eventos estressantes nas terapias contra o câncer, como o tratamento medicamentoso, reduz a habilidade do organismo de regular as respostas inflamatórias resultando num aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias resultando no aparecimento dos sintomas da Síndrome do Comportamento Doentio (Sickness Behavior) (HOCKENBERRY et al., 2011), que pode ser caracterizada pelo aparecimento de sintomas físicos e comportamentais (dentre eles a depressão e a ansiedade), geralmente relacionados à uma infecção ou estado inflamatório generalizado (LEELAND et al., 2003).

A relação da ansiedade e da depressão com o aumento de citocinas pró-inflamatórias tem sido amplamente discutida na literatura, principalmente em modelos experimentais que mimetizam a sepse utilizando o LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli*) (ZAVAN, 2011; SOLATI et al., 2015). É possível observar nesses modelos um aumento da expressão e secreção de citocinas inflamatórias como a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α (SOLATI et al., 2015) e concomitantemente a esse aumento de citocinas é possível observar sintomas comportamentais, como a ansiedade evidenciada pela redução no tempo de exploração do braço aberto do labirinto em cruz elevado (ZAVAN, 2011) assim como a depressão evidenciada pelo aumento da imobilidade no teste do nado forçado e no teste de suspensão pela cauda (POLLAK; YIRMYIA, 2002; PAIVA et al., 2010; ZAVAN, 2011; BIESMANS et al., 2013). Ambos os comportamentos podem ser afetados com o aumento seletivo dessas citocinas inflamatórias (ABRAHAM; JOHNSON, 2009; DANTZER, 2009; BURTON et al., 2011). As citocinas inflamatórias, principalmente a IL-1 β atua nas células endoteliais dos vasos sanguíneos cerebrais, sinalizando de maneira autócrina e parácrina para as células vizinhas, que passam a expressar tanto a IL-1 β como a IL-6, o TNF- α e de maneira sensível a prostaglandina E sintase. Assim, ocorre um aumento

na expressão de PGE₂ (prostaglandina E) que propaga o sinal inflamatório pelo sistema nervoso central sinalizando que no momento ocorre um processo inflamatório no organismo e, a partir daí, surgem as alterações comportamentais (DANTZER, 2009).

A ciclofosfamida, de maneira semelhante ao LPS, induz um aumento seletivo de citocinas pro-inflamatórias (GIRARD et al., 2008), o que corrobora com as alterações comportamentais observadas em nossos estudos. Um dos metabólitos ativos da ciclofosfamida, a acroleína, é capaz de induzir a expressão e secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , assim como um aumento do estresse oxidativo, indicando a ativação do sistema imune em camundongos e ratos (MARTINS et al., 2012; DORNELLES et al., 2013; CHEN et al., 2014; FUJITA et al., 2015; KIM et al., 2015; NAFEES et al., 2015; NURROCHMAD et al., 2015). Porém, a ciclofosfamida alterou o comportamento dos camundongos 48 horas após a administração da ciclofosfamida, diferentemente do LPS que foi capaz de alterar os parâmetros de ansiedade e depressão 2 horas após a administração (ZAVAN, 2011; SOLATI et al., 2015). Isso pode ser explicado pelo fato de que o aumento da expressão e secreção de citocinas inflamatórias após a administração da ciclofosfamida ocorre de maneira lenta e gradativa, onde as citocinas atingem seus picos de concentração em períodos de tempo que variam de 8 a 72 horas (DORNELLES et al., 2013; CHEN et al., 2014), ao contrário do que ocorre com o LPS, que possui uma latência de apenas 2 horas (PAIVA et al., 2010; ZAVAN, 2011; SOLATI et al., 2015).

O presente estudo teve, por objetivo, avaliar tanto os efeitos a curto prazo quanto os efeitos a longo prazo da ciclofosfamida no comportamento das células uNK. Já foi evidenciado que as células uNK respondem rapidamente à outras injúrias, como demonstrado por Zavan (2011), onde o LPS foi capaz de alterar a incidência das células uNK em 30 minutos após a administração, observando alterações por até 4 horas. Uma vez que a ciclofosfamida atinge seu pico de concentração plasmática em 8 minutos, assim como no útero (GIBSON; BECKER, 1970), sugerimos, como hipótese, que a ciclofosfamida fosse capaz de alterar os parâmetros gestacionais após pelo menos uma e duas horas de administração.

Na análise da viabilidade gestacional, ficou evidente na análise macroscópica (número, características dos sítios de implantação e análise das taxas de implantação) que a ciclofosfamida não alterou a viabilidade gestacional em curtos períodos de tempo. A presença esporádica e não representativa de reabsorções pode ser explicada, portanto, pelo curto período de tempo que a droga fez seu efeito. Os dados corroboram com achados na literatura, onde 3 horas não foi suficiente para reduzir as taxas de viabilidade gestacional na injúria por LPS de E.coli, taxa essa que foi tempo dependente já que 6 horas após a administração do LPS a taxa de perda gestacional chegou a 43% (SAVION et al., 2002). Dados semelhantes foram obtidos com o uso da ciclofosfamida. 6 horas após a administração da droga, na concentração de 40mg/kg, a taxa de perda gestacional foi de apenas 6,4%, indicando que o curto período de tempo não foi suficiente para causar danos visíveis, como hemorragias e reabsorções (MAMMON et al., 2006).

Já nos animais tratados com a ciclofosfamida do período de 48 horas pós-administração, a viabilidade gestacional foi severamente comprometida, com uma intensa redução do ganho de peso materno nos dois dias subsequentes à administração da droga, a redução da taxa de viabilidade gestacional para 32,91% e o número elevado de hemorragias e reabsorções em todos os úteros analisados. A análise da viabilidade gestacional a termo evidenciou que, quando a droga é administrada tanto no 8^oddg como no 10^oddg, o índice de perdas gestacionais foi igual a 100% onde foi possível observar que todos os úteros tinham seus sítios de implantação em estágio avançado de reabsorção.

Esses resultados corroboram com os achados na literatura onde as taxas de viabilidade gestacional caem drasticamente quando a ciclofosfamida atua por um período mais prolongado ou é administrada em períodos iniciais da gestação. Quando a droga é administrada, via intraperitoneal, na concentração de 40mg/kg no 12^o dia, as taxas de perdas gestacionais variam de 78% à 87% quando os sítios foram analisados no 19^o ddg (SAVION et al., 2002; SAVION et al., 2003; TORCHINSKY et al., 2005; MAMMON et al., 2006). Quanto mais cedo a droga é administrada, maiores são as taxas de perdas gestacionais, como demonstrou Gibson e Becker (1968), onde a ciclofosfamida foi administrada tanto no 9^oddg quanto no 10^o ddg na concentração de 40mg/kg e o resultado foi uma taxa de

perdas gestacionais no 19º ddg de 100%. Outros fatores também influenciam na viabilidade gestacional frente a ciclofosfamida, como a dose e a via de administração. A dose de 20mg/kg quando administrada no 11º ddg, foi responsável por uma taxa de perdas gestacionais que variam entre 58% a 67% quando os sítios foram analisados no 18º dia de gestação (GIBSON; BECKER, 1968; LONGSDON et al., 2012). A dose de 15 mg/kg administrada do 12º dia de gestação não causou perdas gestacionais estatisticamente significativas quando os sítios foram analisados no 17º dia de gestação (TORCHINSKY et al., 2002). Quando a droga foi administrada por via subcutânea, foi necessário uma dose bem menor (7,5mg/kg) para causar os mesmos 87% de perdas gestacionais causados pela dose de 40mg/kg administrados por via intraperitoneal observados em outros experimentos (LATORRE et al., 2007), dados esse semelhantes aos obtidos por Carneiro e colaboradores (2002) onde 60% dos fetos estavam mortos no 21º dia de gestação quando 7,5mg/kg de ciclofosfamida foi administrada por via subcutânea no 12º dia de gestação.

A análise morfológica dos sítios de implantação do grupo onde a ciclofosfamida atuou por 48 horas mostrou que os sítios apresentavam graus variados de reabsorção, com presença de hemorragia intensa e infiltrado de leucócitos. A presença de hemorragias e infiltrados no sítio de implantação em reabsorção já foi observada em vários modelos de perdas gestacionais como a administração de alta dose de IFN- γ (LI et al., 2014), resistência induzida à progesterona (HIROTA et al., 2012) em modelos de infecção durante a gestação, como a toxoplasmose (COUTINHO et al., 2014). Até mesmo na reabsorção fetal espontânea em ratos wistar foi possível observar a ocorrência destes eventos, que são indicativos de um processo inflamatório local no sítio de implantação (FONSECA et al., 2014). Esse dado corrobora com outros achados na literatura onde a ciclofosfamida é um agente indutor de eventos inflamatórios, aumentando a secreção de citocinas (KIM et al., 2015; NAFEES et al., 2015; NURROCHMAD et al., 2015). As alterações na arquitetura normal nos sítios de implantação incluindo a degeneração da decídua é um evento comum aos sítios de implantação em reabsorção, sendo observado até mesmo na reabsorção fetal espontânea (FONSECA et al., 2014; LI et al., 2014). Os infiltrados de leucócitos, como neutrófilos, ocorre concomitantemente ao aumento dos níveis séricos de

TNF- α (COUTINHO et al., 2014), o que pode explicar a presença de infiltrados nos sítios dos animais tratados por 48 horas, já que a ciclofosfamida é capaz de elevar os níveis séricos de TNF- α (NURROCHMAD et al., 2015).

Já durante a análise morfológica dos sítios de implantação obtidos no 10^o ddg de camundongos dos grupos controle (CT + 1 hora, CT + 2 horas e CT + 48 horas) e submetidos à citoquímica com lectina DBA foram observados dados semelhantes aos obtidos por Paffaro Junior e colaboradores (2003), onde a região mesometrial dos sítios de implantação do 10^o ddg continha células DBA⁺, com região de membrana e grânulos citoplasmáticos fortemente reativos à lectina DBA. Também foi possível observar os 4 subtipos descritos pelo mesmo autor, que distribuíam-se desde a região mais próxima do miométrio até a região próxima do embrião. Os subtipos imaturos de células uNK (I e II) foram encontrados, em sua maioria, nas regiões mais próximas do miométrio, enquanto os subtipos III e IV foram encontrados em sua maioria nas regiões mais próximas do embrião. Esses dados corroboram com os encontrados por Zavan (2011) com animais controle. Assim como na administração do LPS (LIPPE, 2007; ZAVAN, 2011), na indução de lesão embrionária (ROMAN, 2001; COPI, 2006) e das dietas hiperlipídica, hipercalórica e hiperproteica (SALLES, 2014), a ciclofosfamida induziu alterações na reatividade das células uNK à lectina DBA e esta alteração pode indicar uma alteração do perfil das células uNK, já que a aparente degranulação e ausência de marcação das células do subtipo alteradas sugere que elas adquiriram um perfil mais citotóxico (ZAVAN, 2011).

A análise estereológica evidenciou um aumento significativo no número de células uNK DBA⁺ nos sítios de implantação de camundongos submetidos à administração de ciclofosfamida por 1 hora, dados esses não observados nos animais controles e submetidos à administração de ciclofosfamida por 2 horas. Já nos animais submetidos à 48 horas de ação da ciclofosfamida, o número de células uNK DBA⁺ caiu drasticamente comparando com o grupo controle e com os grupos tratados por 1 e 2 horas. Esse dado vem acompanhado pelo aumento de células uNK DBA⁺ na região 3, mais próxima do embrião, em animais do grupo CY + 1 hora, assim como a redução do número de células na região 1 nos animais do grupo CY + 48 horas.

Não há relatos na literatura sobre o número de células uNK nos sítios de implantação de animais submetidos à ciclofosfamida. Porém, os dados referentes à contagem de células NK circulantes em animais submetidos à ciclofosfamida descritos na literatura indicam haver uma redução na contagem de leucócitos circulantes. Por se tratar de uma droga imunossupressora e induzir morte celular preferencialmente em células da população linfocitária (GILANI e CHATZINOFF, 1983), era de se esperar que a ciclofosfamida reduzisse a contagem de células NK no ambiente uterino. Na verdade, em experimento com camundongos da linhagem IRC onde foi administrado 200mg/kg da droga foi observado leucopenia 3 dias após a administração assim como a redução na contagem de células CD3-NK1.1+ tanto no baço como no fígado desses animais no 5 dia após a administração (HARADA et al., 2003). Tal população de células assemelha-se muito às células NK residentes no útero não grávido que são CD3⁻/CD122⁺/DX5⁺/NCR1⁺/CD69⁻/NK1.1⁺ (LIMA et al., 2014).

A ciclofosfamida, na concentração de 150mg/kg administrada por 5 dias consecutivos em camundongos BALB/c reduziu a contagem de células brancas em 55,8% e quando administrada por 15 dias essa redução chegou a 76,6%. Essa mesma concentração de ciclofosfamida reduziu a resposta proliferativa de linfócitos T frente a um mitógeno de células T, a concavalina A (EUN et al., 2013). Lin e colaboradores (2013) observaram que a ciclofosfamida, administrada na concentração de 20mg/kg nos dias 1, 3, 5 e 7 do experimento foi capaz de reduzir a contagem de células brancas no sangue, medula óssea, reduziu a proliferação de esplenócitos e a atividade citotóxica de células NK, assim como a redução da síntese de IL-2 e IFN- γ .

No entanto, a prenhes induz a migração de um subtipo de NK exclusivo do útero gestante que expressa o açúcar N-acetil-D-Galactosamina na membrana e grânulos e que pode ser reconhecida pela lectina DBA (STEWART et al, 1981; PAFFARO JR et al, 2003). Essa uNK DBA⁺ tem um fenótipo CD3⁻CD122⁺DX5⁻NCR1⁺CD69⁺CD117⁺ (YADY et al, 2008) diferente das encontradas no útero virgem destes animais. Isso pode explicar aumento no número de células uNK observado surpreendentemente em nossos estudos após 1 hora da administração da ciclofosfamida.

A ciclofosfamida é capaz de alterar, em nível local, a expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que atuam no recrutamento de células do sistema imunológico principalmente para locais de inflamação. Isso ficou evidente em modelo de cistite induzida pelo metabólito ativo da ciclofosfamida, a acroleína, que foi capaz de alterar a expressão de CXCR1, CXCR2, CXCR3 e CXCR4, todas elas acompanhada pelo aumento da expressão de IL-1 β e TNF- α (YURIDULLAH et al., 2006; SAKTHIVEL et al., 2008; VERA et al., 2008; ARMS et al., 2010; DORNELLES et al., 2013). O aumento da expressão de CXCR2, 1 hora após a administração da ciclofosfamida, é 5,5 vezes maior que a expressão em animais controle (DORNELLES et al., 2013), indicando que esse aumento ocorre rapidamente. Isso pode explicar o aumento de células encontrado nos animais pertencentes ao grupo CY + 1 hora.

Porém, a ciclofosfamida induz danos ao DNA, ativando vias de apoptose em células preferencialmente da linhagem linfocitária (GILANI e CHATZINOFF, 1983). Isso pode explicar a redução no número de células, nos animais tratados com ciclofosfamida por 48 horas, uma vez que a droga teve mais tempo para agir, causar danos ao DNA e induzir a morte celular nessa população celular. Mais estudos devem ser conduzidos com o fim de desvendar os mecanismos pelos quais estas alterações ocorrem.

Também é possível que, como mantenedoras da homeostase uterina (CROY e ASHKAR, 1999, CROY et al, 2013a, CROY et al, 2013b), as uNK seja levadas à proliferarem em resposta à ação da ciclofosfamida, no entanto, não existem dados na literatura que comprovem essa ação. Não obstante, assim como as NK, outras células já demonstraram ação diferenciada frente ao tratamento com ciclofosfamida. Um elegante estudo em camundongos prenhes (MAMMON et al., 2006) mostrou forte atividade antiproliferativa e alta incidência de apoptose após a administração da ciclofosfamida na concentração de 40mg/kg no embrião, no entanto, sobre as células da placenta, a ação anti-proliferativa e apoptótica da ciclofosfamida foi reduzida. Esses autores sugeriram que com a progressão da gestação, a proliferação celular no ambiente uterino pode superar a perda celular causada pela apoptose induzida pela ciclofosfamida.

A análise dos subtipos dos animais controle (CT + 1 hora, CT + 2 horas e CT + 48 horas) revelou um padrão de distribuição dos subtipos assim como descreveram Paffaro JR e colaboradores (2003) e Zavan (2011), onde o subtipo imaturo I, que corresponde ao subtipo que é recrutado para o ambiente uterino após a implantação do blastocisto, habita preferencialmente a região 1, mais próxima ao miométrio. Já o subtipo II, também imaturo e com poucos grânulos reativos à lectina DBA habitava em grande número tanto a região I quanto a região II, que corresponde ao endométrio decidualizado. O subtipo III, subtipo maduro de células uNK, habitava ambas as regiões, porém em maior número nas regiões 2 e 3 e por fim o subtipo 4, considerado o subtipo mais senescente, que era encontrada na região 3, mais próxima do embrião.

O tratamento com ciclofosfamida realizado nesse estudo, no entanto, foi capaz de alterar a distribuição das células uNK DBA⁺ no ambiente uterino nos períodos de 1, 2 e 48 horas após o tratamento da ciclofosfamida, a exemplo do que foi encontrado por ZAVAN (2011), que mostrou que a administração de LPS de E.coli foi capaz de alterar a distribuição de células uNK 30 minutos após a administração. No entanto, esse autor relatou que 4 horas após a administração do LPS as células uNK tinham sua expressão de N-acetil-D-galactosamina reestabelecida em seus grânulos e superfície, fato esse não observado neste estudo.

Nos animais tratados com ciclofosfamida pelo período de 1 hora, ficou evidente que houve uma redução significativa no número de células do subtipo 2 na região 1 e nos animais submetidos à administração da ciclofosfamida por duas horas, esse padrão de alterações mudou, com a redução significativa de células do subtipo 3 na região II e III.

Portanto, estes resultados sugerem que as alterações na expressão de N-acetil-galactosamina em nossos estudos ocorreu primeiramente nas regiões mais próximas do miométrio, sendo o subtipo II mais sensível à ação da ciclofosfamida e, com a difusão da droga pela região mesometrial dos sítios de implantação, as alterações passaram a ser observadas nas regiões mais próximas do embrião. Esse padrão de alterações é diferente do observado por Copi (2006) onde, após lesão intencional do embrião, as alterações ocorriam

primeiro nas regiões mais próximas do embrião e seguiam, com o passar do tempo, para as regiões mais próximas do miométrio e vasos sanguíneos.

Uma hipótese que explicaria a diferença na cinética das alterações nas uNK observada em nossos estudos quando comparado aos resultados de Copi (2006) seria a seguinte: em nossos estudos a administração da ciclofosfamida nos camundongos prenhes foi realizada intraperitonealmente, sendo assim, a droga alcança o ambiente uterino via vasos sanguíneos mesometriais que irrigam os sítios de implantação, podendo se difundir ao longo do miométrio, em regiões mais distantes do embrião, para as regiões mais próximas do embrião, explicando a diminuição de células do subtipo dois em região distante do embrião e de células do subtipo 3 em regiões mais próximas a ele, bem como, o aparecimento de células uNK alteradas. Em seus estudos, Copi (2006) sugeriu que a lesão embrionária induziu um gradiente de alteração nas uNK no sentido oposto, pois o insulto é provocado no sentido contrário àquele realizado em nosso estudo.

A diferenciação e proliferação celular ocorrem, na região mesometrial dos sítios de implantação, em regiões específicas, onde podemos observar intensa proliferação celular na região 2, evidenciada pela marcação positiva para PCNA em células uNK DBA⁺, assim como células maduras, do subtipo III, na região 2 (PAFFARO JR et al., 2003).

Esses dados de Paffaro JR e colaboradores (2003) em conjunto com os obtidos em nosso estudo até o momento sugerem fortemente que, sob tratamento da ciclofosfamida pelo período de duas horas, houve uma redução tanto na proliferação quanto na diferenciação celular dos subtipos II e III na região 2. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos afim de comprovar experimentalmente tais dados, uma vez que concomitantemente à redução de células do subtipo II na região 1 em animais tratados com ciclofosfamida por 1 hora, e a redução de células do subtipo II e III na região 2 após duas horas, podemos observar um aumento significativo de células do subtipo alteradas, em todas as regiões. Assim sendo, é possível que a diminuição de uNK dos subtipos II e III em nossos estudos possa ter ocorrido não apenas em função da alteração na diferenciação e atividade anti-proliferativa, mas também como consequência

da mudança de fenótipo destas células para uNK alteradas no útero em respostas às injúrias causadas pela ciclofosfamida.

Já nos grupos tratados com ciclofosfamida por 48 horas, houve uma intensa redução no número de células dos subtipos I, II e III nas regiões 1, 2 e 3, diferentemente do observado por ZAVAN (2011) com a administração do LPS onde, após 4 horas, o padrão de expressão do açúcar N-acetil-d-galactosamina foi semelhante os animais do grupo controle. Porém, a ciclofosfamida é uma droga que induz morte celular por apoptose em células de origem linfocitária (GILANI e CHATZINOFF, 1983), e a redução do número de células pode ser explicada por um aumento da apoptose nesses subtipos. O aumento do número de células do subtipo alteradas em ambas as regiões é semelhante ao aumento observado nos demais grupos tratados com a ciclofosfamida, indicando que os efeitos da droga são mais duradouros que os observado por Zavan (2011) após LPS. De fato isso pode ocorrer, uma vez que o LPS é capaz de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias rapidamente (PAIVA et al., 2010; SOLATI et al., 2015) enquanto o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias após a administração da ciclofosfamida pode ocorrer até 72 horas após a administração da droga (DORNELLES et al., 2013; CHEN et al., 2014). Recentemente em nosso laboratório (Salles, 2014) foi observado que o tratamento de camundongos com ração hiperlipídica e hipercalórica até o 10^o ddg também provocou o aparecimento de muitas células uNK alteradas quanto a expressão de N-acetil-D-galactosamina. Esse autor sugeriu que o tratamento com essa ração causou também inflamação, a exemplo do observado por Zavan (2011) com uso do LPS.

A existência de células do subtipo alteradas em grandes quantidades, com descontinuidade na marcação de membrana, assim como alterações na reatividade dos grânulos e existência de grânulos com aspecto vazio podem indicar um perfil mais citotóxico induzido pela ciclofosfamida, assim como observou Zavan (2011) com a administração do LPS e Salles (2014) por meio da dieta hiperlipídica. A existência de grânulos com aspecto vazio pode indicar perda do conteúdo granular, como por exemplo, a liberação da perforina por exocitose dos grânulos citoplasmáticos após lesão embrionária induzida (COPI, 2006). Em outro estudo utilizando a técnica de lesão embrionária foi observado

um aumento na expressão tanto de perforina quanto de IFN γ , sugerindo que houve perda do conteúdo granular e aumento da expressão dos genes para repor os grânulos, esvaziados por exocitose (DEGAKI, 2008).

Foi identificada a presença de muitos núcleos apoptóticos na região de decídua, tanto em células DBA⁺ quanto em células DBA⁻ em todos os animais tratados com ciclofosfamida, ao passo que os núcleos picnóticos eram raros nos animais controle. A presença de núcleos apoptóticos sugere fortemente a presença de apoptose nestas células, interessantemente incluindo as células uNK DBA⁺. Esses dados corroboram com os dados encontrados por Gonzáles e colaboradores (2012) que observavam em humanos que células NK CD56⁺ que tinham núcleos apoptóticos visíveis (quando conjugadas com células DC-SIGN+), marcavam-se com anexina V e eram TUNEL positivas, ou seja, eram células em apoptose. Os achados também vão de encontro com dados observados por Kukasabe e colaboradores (2007b) onde a presença de núcleos apoptóticos em células do labirintotrofoblasto de sítios provenientes de aborto sugeririam fortemente a presença de células apoptóticas em camundongos.

Portanto, podemos concluir que o insulto de administração de ciclofosfamida é capaz de causar rapidamente alterações marcantes no número dos subtipos de uNK e na expressão de N-acetil-D-Galactosamina, de maneira semelhante àquela observada quando camundongos são submetidos a lesão embrionária (COPI, 2006; DEGAKI, 2008), ou com LPS (LIPE, 2007, ZAVAN, 2011) durante a gestação, sem contudo, alterar a viabilidade embrionária e comportamento dos animais até 2 horas após a lesão. Essas alterações diagnosticadas rapidamente após ao tratamento com ciclofosfamida e em função do uso da lectina DBA em nossos experimentos, foi concomitante ao aparecimento de muitas células uNK DBA reativas com núcleos picnóticos, indicativo de sua morte por processo de apoptose. No entanto, a ciclofosfamida na dosagem utilizada em nossos estudos se mostrou droga de efeito drástico na gestação de camundongos e que além de provocar rapidamente o aparecimento de células uNK alteradas para expressão de N-acetil-galactosamina, parece provocar sua morte por apoptose com significativa diminuição de sua quantidade após 48 horas da administração. Tal efeito contundente na gestação de camundongos é capaz de levar a 100% de perda fetal diagnosticada naquele

que seria o período final da prenhez em nossos estudos. O conjunto de resultados obtidos sugerem que as uNK respondem rapidamente ao tratamento pela ciclofosfamida em função da propriedade inflamatória dessa droga (KIM et al., 2015; NAFEES et al., 2015; NURROCHMAD et al., 2015) a exemplo do encontrado em estudos anteriores com uso de LPS (LIPE, 2007 e Zavan, 2011), lesão embrionária (COPI, 2006; DEGAKI, 2008) e dieta hiperlipídica e hipercalórica (Salles, 2014).

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no experimento, é possível concluir que:

A ciclofosfamida não foi capaz de alterar o comportamento dos animais tratados por 1 e 2 horas mas foi capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo e ansiogênico, semelhante ao comportamento doentil 48 horas após a administração da droga;

A ciclofosfamida não reduziu a viabilidade gestacional a curto prazo, após 1 e 2 horas após a administração, mas reduziu drasticamente a viabilidade gestacional após 48 horas, com intensa taxa de reabsorção embrionária, sítios hemorrágicos, intenso infiltrado de leucócitos e reepitelização luminal concomitantemente ao aparecimento de comportamento doentil nesses animais

Nossas análises da prenhez a termo demonstrou que a ciclofosfamida inviabilizou a gestação, quando administrada no 8^oddg e no 10^oddg, com perdas gestacionais em ambos os grupos tratados na ordem de 100%;

A seletividade da citoquímica à lectina DBA permitiu a análise morfológica e estereológica das células uNK no útero no décimo dia de gestação, sendo possível caracterizar os 4 subtipos da célula, mostrando eficiência do método já descrito na literatura.

A ciclofosfamida provocou aumento no número total de células uNK reativas à lectina DBA após 1 hora de sua administração, com aumento significativo de células uNK alteradas, acompanhado pela redução de células do subtipo II na região 1 dos sítios de implantação, sugerindo que essa droga atue primeiramente em regiões próximas a vascularização (mesométrio) uterina, ou seja na região 1 e sobre células uNK do subtipo 2

A ciclofosfamida não alterou a contagem total do número de células quando a droga agiu por 2 horas mas reduziu a contagem do subtipo III nas regiões 2 e 3 dos sítios de implantação, seguido por um aumento de células do subtipo alterada em todas as regiões, sugerindo que após 2 horas essa droga atingiu células uNK do subtipo 3 mais próximas ao embrião

O tratamento por 48 horas com a ciclofosfamida causou uma redução importante do número total de células uNK, assim como em todas as regiões analisadas, acompanhado pela redução de células do subtipo I, II e III nas regiões 1 e 2 dos sítios de implantação, redução do subtipo III na região 3 e

aumento do subtipo alterada em todas as regiões;- Foi possível observar núcleos picnóticos indicativos de apoptose, em todos os sítios de implantação de animais tratados com a ciclofosfamida, independentemente do período de tratamento, indicando que a ciclofosfamida induz apoptose em células uNK reativas à lectina DBA, o que explica a redução em número dessas células em períodos adiantados após o tratamento e sugere o efeito citotóxico desta droga sobre as uNK.

A análise comportamental, principalmente nos parâmetros relacionados ao estresse, foram importantes para avaliar não só os efeitos da ciclofosfamida causadores de comportamento semelhante ao comportamento doentil, mas também para avaliar as condições de manutenção dos animais utilizados no experimento.

Nossos resultados em conjunto nos permitem concluir de forma inédita que a ciclofosfamida rapidamente provoca o aumento de células uNK no útero, bem como, alterações na expressão de N-acetil-D-galactosamina em seus grânulos e superfície, atingindo primeiramente células uNK do subtipo 2 próximas ao mesométrio, e posteriormente células dos subtipos 2 e 3 em regiões mais próximas ao embrião. No entanto, seu efeito drástico na gestação provoca diminuição no número de células uNK do subtipo 2, 3 e 4 após 48 da administração, concomitante ao aparecimento de muitos sítios em reabsorção caracterizando a diminuição da viabilidade gestacional, bem como, o estabelecimento de comportamento semelhante ao comportamento doentio nesses animais. Comportamento esse compatível com a perda embrionária de 100% observada em nossos estudos da prenhez a termo após o uso de dessa droga.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural Study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomy and Embryology**. São Paulo, v. 116, p. 263-274, 1983.

ABRAHAM, J.; JOHNSON, R.W. Central inhibition of interleukin-1 β ameliorates sickness behavior in aged mice. **Brain Behaviour Immunology**. Urban, v. 23, p. 396-401, 2009.

ACAR, N.; USTUNEL, I.; DEMIR, R. Uterine Natural Killer (uNK) cells their missions during pregnancy: a review. **Acta Histochemica**. Antalya. v. 113, p. 82-91, 2011.

AHMAD, F. et al. Modulatory effect of a unani formulation (*Jawarish amla sada*) of cyclophosphamide induction toxicity in tumor bearing mice. **British Journal of Medicine and Medical research**. New Dehli. V. 2, p. 454-468, 2012.

ALIFRANGIS, C.R.A. et al. EMA/CO for high-risk gestacional trophoblastic neoplasia: good outcomes with induction low-dose etoposide-cisplatin and genetic analysis. **Journal of clinical Oncology**. London. v. 31, p. 280-286, 2013.

ALKAABI, J.K. et al., Successful treatment of severe thrombocytopenia with rimoplostim in a pregnant patient with systemic lupus erytematosus. **Lupus**. Oman. v. 21, p. 1571-1574. 2012.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (A.C.R). Cyclophosphamide (Cytoxan). 2013. p.1-4.

APLIN, J.D; GLASSER, S.R. The interaction of trophoblast with endometrial stroma. **Endocrinology of embryo-endometrium interactions**. New York, p. 327-314, 1994.

ARMS, L., et al. Expression and function of CXCL12/CXCR4 in rat urinary bladder with cyclophosphamide-induced cystitis. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**. Burlington, v. 298, p. F589-F600, 2010.

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

AUROUX, M.R. et al. Cyclophosphamide in the male rat: biochemical changes in progeny. **Biomed and Pharmacoterapy**. Kremilin Bicêtre, v. 44, p. 519-523, 1990.

AUROUX, M.R. et al. Cyclophosphamide in the F0 male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. **Mutation Research**. Kremilin Bicêtre, v. 229, p. 189-200, 1990b.

AUZARY, C. et al. Pregnancy in patients with Wegner's granulomatosis: report of five cases in three women. **Annals of the Rheumatic Diseases**. Le Kremlin-Bicêtre. v. 59, p. 800-804, 2000.

AVISTUR, R.; SHERIDAN, J.F. Neonatal stress modulates sickness behavior. brain **Behaviour Immunology**. v. 23, p. 977-985, 2009.

AYDNER, A. et al. The roles of surgery and EMA/CO chemotherapy regimen in primary refractory and non-refractory gestational trophoblastic neoplasia. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. Instambul. v. 138, p. 971-977, 2012.

BARAKONYI, A. et al. cell death mechanisms and potentially cytotoxic natural immune cells in human pregnancies complicates by preeclampsia.

Reproductive Sciences. Pecs. v. 0; p. 1-12. 2013.

BAILEY, M.M. et al. Prior exposure to Indole-3-Carbinol decreases the incidence of specific cyclophosphamide-induced developmental defects in mice.

Birth Defects Research. Tuscaloosa, v. 74, p. 261-267, 2005.

BANNERMAN, D.M. et al. Regional dissociations within the hippocampus — memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. Oxford, v. 28, p. 273-283, 2004.

BEAMAN, K.D. et al. Future directions of clinical laboratory evaluation of pregnancy. **Cellular and Molecular Immunology**. North Chicago, v. 11, p. 582-588, 2014.

BEHRINGER, K. et al. gonadal function and fertility in survivors after hodgkin lymphoma treatment within the german hodgkin study group HD13 to HD15 trials. **Journal of Clinical Oncology**. San Diego. v. 31, p. 231-239, 2013.

BELLELIS, P. et al. Transcriptional changes in the expression of chemokines related to natural killer and T-regulatory cells in patients with deep infiltrative endometriosis. **Fertility and Sterility**. São Paulo. v. 99, p. 1987-1993, 2013.

BERNARD, O. et al. immunological Studies of Mouse Decidual Cells. I- Membrane Markers of Decidual Cells in the Days after Implantation. **Journal of Experimental Medicine**. New York. v. 148(2), p. 580-591, 1978.

BHAT, R.; ROMMELAERE, J. NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells mediated by natural cytotoxicity receptors (NCR's) and stimulated by parvovirus infection of target cells. *BMC Cancer*. Heidelberg. V.13:367, 2013.

BIESMANS, S. et al. systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of Inflammation**. Diepenbeek, v. 2013, p. 1-14, 2013.

BORZYCHOWSKI, A.M. et al. Functional analysis of murine uterine natural killer cells genetically devoid of oestrogen receptors. **Placenta**. Guelph. v .24, p. 403-411, 2003.

BULMER J.N., WILLIAMS, P.J., LASH, G.E. Immune cells in the placental bed. **Int. J. Dev. Biol**. Newcastle, v. 54, p. 281–94, 2010.

BURKHARDT, J.K. et al. The lytic granules of natural killer cells are dual-functions orgelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *The Journal of Cell Biology*. Durham. V.111, p.2327-2340, 1990.

BURTON, M.D. et al. Inhibition of interleukin-6 trans-signaling in the brain facilitates recovery from lipopolysaccharide-induced sickness behavior. **Journal of Neuroinflammation**. Urbana, v. 8, p. 54-67, 2011.

CAMPBELL, K.S.; HASEGAWA, J. Natural Killer cell biology: an update and future directions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. Philadelphia. v. 132(3),p. 536-544, 2013.

CAMPBELL, J.J. et al. Unique subpopulations of CD56⁺ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. **The journal of immunology**. v. 166, p. 6477-6482. 2001.

CAO.Q. et al. Genetic deletion of cxcl14 in mice alters uterine NK cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Beijing. v. 435, p. 664-670, 2013.

CARDONICK, E.; GILMANDYAR, D.; SOMER, R.A. Maternal and neonatal Outcomes of Dose dense chemotherapy for breast cancer in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**. New York.v. 120, p. 1267-1272, 2012.

CARLINO, C. et al. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. **Blood**, v. 111, p. 3108–3115, 2008.

CARNEIRO, M.R.G. et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by b-ionone. **Toxicology Letters**. Rio de Janeiro, v. 138, p. 205-213, 2002.

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

CASTEELS, K. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 restores sensitivity to cyclophosphamide induced apoptosis in non-obese diabetic (NOD) mice and protect against diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. Leuven, v.112, p.181-187, 1998.

CERDEIRA, A.S. et al. Conversion of peripheral blood to a decidual NK-like phenotype by a cocktail of defined factors. **The Journal of immunology**. Boston. v. 198(8), p. 3939-3948, 2013.

CEVALLOS, G.C. et al. Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**. Cidade do México, v. 46, p. 567-574, 2008.

CHAHOUD, I. et al. Maternal protein-and-energy restriction reduces the developmental toxicity of cyclophosphamide and hydroxyurea in rats. **Toxicology**. Berlim, v. 179, p. 137-149, 2002.

CHEN, Y.T. et al. Extracorporeal shock wave therapy ameliorates cyclophosphamide-induced rat acute interstitial cystitis through inhibiting inflammation and oxidative stress-in vitro and in vivo experiment studies. **American Journal of Translational Research**. Kaohsiung, v. 6, p. 631-648, 2014.

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

CHAKRABORTY, D. et al. Natural Killer cells direct hemochorial placentation by regulating hypoxia-inducible factor dependent trophoblast lineage decisions. **PNAS**. Kansas City. v. 108, p. 16295-16300, 2011.

CHAKRABORTY, D., KARIM RUMI, M.A., SOARES, M.J. NK cells, hypoxia and trophoblast cell differentiation. **Cell Cycle**. Kansas City. v. 11(13), p. 2427-2430, 2013.

CHRISTIE, L.A. et al. Impaired cognitive function and hippocampal neurogenesis following cancer chemotherapy. **Clinical Cancer Research**. Irvine, v. 18, p. 1954-1965, 2012.

CHAN, A. et al. CD56^{bright} human NK cells differentiate into CD56^{dim} cells:role of contact with peripheral fibroblasts. *The journal of Immunology*. Birmingham. v. 179, p. 89-94, 2007.

CLEELAND, C.S. et al. Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? **Cancer**. Texas, v. 97, p. 2919-2925, 2003.

CLOWSE, M.E.B. et al. Pregnancy outcomes among patients with vasculitis. arthritis care and research. **Durhan**. V. 65, p. 1370-1374, 2013.

CO, E.C. et al. Maternal decidual macrophages inhibit bk cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy. **Biology of Reproduction**. San Francisco. v. 88(6),155, 1-9, 2013.

COLUCCI, F.; CALIGIURI, M.A.; DI SANTO, J.P. What does it take to make a natural killer? **Nature Reviews – Immunology**. Paris. v. 3; p. 413-425, 2003.

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

COUTINHO, L.B. et al. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression.

International Journal for Pharmacology. Uberlandia, v. 42, p. 341-352, 2012.

COSTAPINTO, L. et al. Giant Disseminated condylomatosis in SLE. **Lupus**. Salvador. v. 21, p. 332-334, 2012.

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

CROY, B.A. et al. Uterine Natural Killer Cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. **American Journal of Reproductive Immunology**. Guelph. v. 37, p. 463-470, 1997.

CROY, B.A. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? **Journal of Reproductive Immunology**. Guelph. v. 42, p. 127-129, 1999.

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. **Journal of Reproductive Immunology**. Guelph. v. 59, p. 175-191, 2003a.

CROY, B.A. et al. Uterine Natural Killer cells: insights to their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**. Guelph. v. 126(2), p. 149-160, 2003b.

CROY, B.A. et al. Uterine Natural Killer Cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunological Reviews*. Kingston. v. 214, p. 161-185, 2006.

CROY, B.A. et al. Analysis of Uterine Natural Killer Cells in mice. **Methods in Molecular Biology**. Kingston, v. 612, p. 465-503, 2010.

CUI, Y. et al. Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodeling in pregnancy. **Nature**. Cleveland. v. 484, p. 246-252, 2012.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. Urbana, v. 29, p. 247-264, 2009.

DEGAKY, K.Y. Perfis de expressões dos genes de mediadores envolvidos na resposta imune inata de células UNK de camundongos na gestação normal e sob estresse induzido pela lesão cirúrgica do embrião. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural). Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

DEGAKI, K.Y. et al. Delta-like ligant (DLL) 1 expression in early mouse decidua and its localization to uterine natural killer cells. **PLOS ONE**. Kingston. v. 7, e52037, p.1-9, 2012.

DEY, S.K. et al. Molecular cues to implantation. **Endocr. Rev.** Nashville, v. 25, p. 341–73, 2004.

DORNELLES, F.N. et al. Role of CXCR2 and TRPV1 in functional, inflammatory and behavioural changes in the rat model of cyclophosphamide-induced

haemorrhagic cystitis. **British Journal of Pharmacology**. Florianópolis, v. 171, p. 452-467, 2013.

DRAKE, P.M. et al. Human Placental Cytotrophoblasts attract monocytes and CD⁵⁶^{bright} killer cells via the actions of monocyte inflammatory proteins 1 α . **The Journal of Experimental Medicine**. San Francisco. v. 193, p. 1199-1212, 2001.

DROBIECKI, A. et al. Acquired hemophilia in patient suffering from rheumatoid arthritis: case report. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**. Lublin. v. 00, p. 1-7, 2013.

DULIOUST, E.J.B. et al. Cyclophosphamide in the male rat: new pattern of anomalies in the third generation. **Journal of Andrology**. Kremilin Bicêtre, v. 10, p. 296-303, 1989.

ERLEBACHER, A. Immunology of the maternal-fetal interface. **Annual Review of Immunology**. New York. v. 31, p. 387-411, 2013.

EUN, J.S. et al. Lactobacillus plantarum HY7712 Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice. **Journal of Microbiology Biotechnology**. Seoul, v. 23, p. 414,421, 2013.

FEHNIGER, T.A. et al. CD⁵⁶^{bright} natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T-cell derived IL-2: a potential new link between adaptative and innate immunity. **Blood**. Columbus. v. 101, p. 3052-3057, 2003.

FERLAZZO, G. et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cell from secondary lymphoid organs. **PNAS**. New York. v. 101, p. 16606-16611, 2004.

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

FONSECA, B.M. et al. Rat spontaneous foetal resorption: altered α 2-macroglobulin levels and uNK cell number. **Histochemical Cell Biology**. Porto, v. 142, p. 693-701, 2014.

FUJITA, M. et al. A novel method for assessing bladder-related pain reveals the involvement of nerve growth factor in pain associated with cyclophosphamide-induced chronic cystitis in mice. **European Journal of Pain**. Osaka, p. 1-13, 2015.

FUKUI, A., FUNAMIZU, A., YOKOTA, M., Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. **J Reprod Immunol**. Osaka, v. 90(1), p. 105-110, 2011.

GELLERSEN, B., BROSENS, I.A., BROSENS, J.J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Semin. Reprod. Med.** Hamburgo, v. 25, p. 45–53, 2007.

GIBSON, J.E.; BECKER, B.A. The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. **Cancer research**. Iowa City. v. 28, p. 475-480, 1968.

GIBSON, J.E.; BECKER, B.A. Effect of Phenobarbital and SKF525A on placental transfer of cyclophosphamide in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Iowa City, v. 177, p. 256-262, 1970.

GILANI, S.H.; CHATZINOFF, M. Embryopathic effects of cyclophosphamide. **Environmental Research**. Newark. v. 31, p. 296-301, 1983.

GIRARD, B.M. et al. Exaggerated Expression of Inflammatory Mediators in Vasoactive Intestinal Polypeptide Knockout (VIP^{-/-}) Mice with Cyclophosphamide (CYP)-Induced Cystitis. **Journal of Molecular Neuroscience**. Burlington, v. 36, p. 188-199, 2008.

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**. Miami, v. 72, p. 262-269, 2014.

GONZÁLEZ, I.T. et al. Apoptotic DC-SIGN⁺ cells in normal human decidua. **Placenta**. Granada, v. 33, p. 257-263, 2012.

GONZALES, E.J. et al. The Effects of Tempol on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress in Rat Micturition Reflexes. **The Scientific World Journal. Burlington**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

GORIDODSKY, M. et al. TNF- α Messenger RNA and Protein Expression in the Uteroplacental Unit of Mice with Pregnancy Loss. **The Journal of Immunology**. Tel Aviv, v. 160, p. 4280-4288, 1998.

GORIVODSKY, M. et al. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) expression in the uteroplacental unit of mice with spontaneous and induced pregnancy loss.

Clin.Exp.Immunol. Tel Aviv. v. 117, p. 540-549, 1999.

GREEN, D.M. et al. The cyclophosphamide Equivalent Dose as an Approach for Quantifying Alkylating Agent Exposure: a report from the childhood cancer survivor study. **Pediatric Blood Cancer.** Memphis. v. 61(1), p. 53-67, 2013.

HALDAR, S. et al. Inflammation and Pyroptosis Mediate Muscle Expansion in an Interleukin-1 β (IL-1 β)-dependent Manner. **The journal of Biological Chemistry.** Los Angeles, v. 290, p. 6574-6583, 2015.

HANNA, J. et al. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16⁻ human natural killer. **Blood.** Jerusalem. v. 102, p. 1569-1577, 2003.

HANNA, J. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nature Medicine.** Jerusalem. v. 12, p. 1065-1074, 2006.

HARADA, T. et al. Effect of SCG, 1,3-b -D-Glucan from *Sparassis crispa* on the Hematopoietic Response in Cyclophosphamide Induced Leukopenic Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** Saitama, v. 25, p. 931-939, 2002.

HARWARD, L.E. et al. The impact of cyclophosphamide on menstruation and pregnancy in women with rheumatologic disease. **Lupus.** v. 22, p. 81-86, 2012.

HATTA, K. et al. Emerging themes in uterine natural killer cell heterogeneity and function. **American journal of Reproductive Immunology**. Kingston. v. 68, p. 282-289, 2013.

HAUGER, R.L. et al. Role of CRF Receptor Signaling in Stress Vulnerability, Anxiety, and Depression. **Annals of the New York Academy of Sciences**. San Diego, v. 1179, p. 120-143, 2009.

HAUMONTE, J.B. et al. Enhanced Prevalence of Plasmatic Soluble MHC Class I Chain-Related Molecule in Vascular Pregnancy Diseases. **BioMed Research International**. Marselie, v. 2014, 2014.

HAYAKAWA, Y.; SMYTH, M.J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness migratory capacity. **The Journal of Immunology**. Victoria. v. 176, p. 1517-1524, 2006.

HE, Y.Y. et al. The decidual stroma cells secreted CLL2 induces and maintains decidual leucocytes into Th2 bias in human early pregnancy. **Clinical Immunology**. ,v. 145, p.161-173, 2012.

HELIGE, C. et al. Distribution of decidual natural killer cells and macrophages in the neighbourhood of the trophoblast invasion front: a quantitative evaluation. **Human Reproduction**. Graz, v. 29, p. 8-17, 2014.

HERGERGER, M. Immune balance at the foeto-maternal interdice as the fulcrum reproductive success. **Journal of Reproductive Immunology**, Cambridge. v. 97, p. 36-42, 2013.

HERINGOVÁ, L. et al. Cell-Cycle Alterations Underlie Cyclophosphamide-Induced Teratogenesis in the Chick Embryo. **Birth Defects Research**. Praga, v. 67, p. 438-443, 2003.

HENDERSON, T.A. et al. Steroid Receptor Expression in Uterine Natural Killer Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. Oxford. v. 88(1), p. 440-449, 2003.

HIBY, S.E. et al. Combinations of maternal KIR and Fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. **The Journal of Experimental Medicine**. Cambridge. v. 200(8), p. 957-965, 2004.

HIBY, S.E. et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Human Reproduction**. Cambridge. V. 23(4), p. 972-976, 2008.

HIROTA, Y. et al. Galectin-1 Markedly Reduces the Incidence of Resorptions in Mice Missing Immunophilin FKBP52. **Reproduction Development**. Tokyo, v. 153, p. 2486-2493, 2012.

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

HOCKENBERRY, M.J. et al. Sickness Behavior Clustering in Children With Cancer. **Journal of Pediatric Cancer Nursing**. Minneapolis, v. 28, p. 263-272, 2011.

HOFMANN, A.P.; GERBER, S.A., CROY, B.A. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. **Molecular Human Reproduction**. Kingston, v. 20, p. 66-76, 2014.

HUDSPETH, K. et al. The role of natural killer cells in autoimmune liver disease: a comprehensive review. **Journal of autoimmunity**. Milan. v. 46, p. 55-65, 2013.

HOLLADAY, S.D. et al. Maternal immune stimulation in mice decreases fetal malformations caused by teratogens. **International Immunopharmacology**. Blacksburg, v. 2 , p. 325-332, 2002.

ISHIZUKA, S.; SATOU, S. A case of delivery of healthy infant in breast cancer patient incidentally with goserelin acetate and tamoxifen during pregnancy. **Breast Cancer**. Himeji. 2013.

JANSSEN, N.M.; GENTA, M.S. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy and lactation. *Arch.Intern.Med.* Houston. v. 160, p. 610-619, 2000.

JONES, R.K. et al. Apoptosis, bcl-2 expression and proliferative rate activity in human endometrial stroma and endometrial granulated lymphocytes. **Biology of Reproduction**. Newcastle, v. 58, p. 995-1002, 1998.

JUNOVICH, G. et al. Endometrial CD16⁺ and CD16⁻ NK cell count in fertility and unexplained infertility. **American Journal of Reproductive Immunology**. Buenos Aires, v. 709, p. 182-189, 2013.

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

KARP, J.D.; SMITH, J.; HAWK, K. Restraint stress augments antibody production in cyclophosphamide-treated mice. **Physiology and Behavior**. New Jersey, v. 70, p. 271-278, 2000.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implicatios for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. **Biology of Reproduction**. Aachen, v. 69, p. 1-7, 2003.

KESKIN, D.B. et al. TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood peripheral NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. **PNAS**. Cambridge, v. 104, p. 3378-3383, 2007.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. **Eur.J.Immunology**. Uppsala, v. 5, p. 112-117, 1975.

KIM, M. et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodeling during pregnancy. **EMBO Molecular Medicine**. Daejeon, v. 5, p. 1415-1430, 2013.

KIM, S.H. et al. Diallyl Disulfide Prevents Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats through the Inhibition of Oxidative Damage, MAPKs, and NF- κ B Pathways. **Biomolecules and Therapeutics**. .Chungbuk, v. 23, p. 180-188, 2015.

KING, A. et al. Human uterine lymphocytes. **Human Reproduction**. Cambridge, v. 4(5), p. 480-485, 1998.

KOKUBU, K. et al. Differentiation and Elimination of uterine natural killer cells in delayed implantation and parturition mice. *Journal of Reproduction and Development*. Kita-Kyushu, v.51, p.773-776, 2005.

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.

KURODA, K. et al. Elevated Periimplantation Uterine Natural Killer Cell density in human Endometrium Is Associated With Impaired Corticosteroid Signaling in Decidualizing Stromal Cells. **J Clin Endocrinol Metab**. Coventry, v. 98, p. 4429-4437, 2013.

KUSAKABE, K. et al. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. **J.Vet.Med.Sci**. Osaka, v. 61(10), p. 1093-1100, 1999.

KUSAKABE, K. et al. Effect of Danazol on NK cells and cytokines in the mouse uterus. **Journal of Reproductive and Development**. Osaka, v. 53, p. 87-94, 2007.

KUKASABE, K. et al. Regulation of natural killer cell cytotoxicity and enhancement of complement factors in the spontaneously aborted mouse placenta. **Fertility and Sterility**. Osaka, v. 90, p. 1451-1459, 2007b.

LAMPRECHT, P. et al. Elevated monocytic IL-12 and TNF- α production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and

corticosteroid therapy. **Clinical and Experimental Immunology**. Luebeck, v. 128, p. 181-186, 2002.

LATORRE, A.O.; HUEZA, I.M.; GÓRNIK, S.L. Association of Ipomoea cónnea and BCG reduces birth defects caused by cyclophosphamide in rats. **Life Sciences**. São Paulo, v. 80, p. 430-435, 2007.

LAZALDE, B.; FLORES, J.G.; ROMERO, F.G. Klippel-Feil Syndrome in a box Exposed Inadvertently to cyclophosphamide during pregnancy: a case report. **Birth Defects Research**. Durango, v. 94, p. 249-252, 2012.

LEE, S.W. et al. Natural Killer Dendritic Cells Enhance Immune Responses Elicited m α -galactosiceramide-stimulated Natural Killer t cells. **BioMed Research international**. Seoul, v. 2013, 2013.

LI, Z.Y. et al. IFN- γ induces aberrant CD49b+ NK cell recruitment through regulating CX3CL1: a novel mechanism by which IFN- γ provokes pregnancy failure. **Cell Death and Disease**. Beijing, v. 5, e1512, 2014.

LIN, G. et al. Beneficial effects of 20(S)-protopanaxadiol on antitumor activity and toxicity of cyclophosphamide in tumor-bearing mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Changchun, v. 5, p. 443-447, 2013.

LIMA, P.D.A. et al. Heterogeneity in composition of mouse uterine Natural killer cells. **Journal of Leucocyte Biology**. Kingston, v. 92, p. 1-10, 2012.

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

LIMA, P.D.A. et al. Ly49 receptors activate angiogenic mouse DBA⁺ uterine natural killer cells. **Cellular and Molecular Immunology**. Kingston, v. 11, p. 467-476, 2014b.

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

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

LIU, J.Y. et al. Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. **Cancer Immunol Immunother**. Guangdong, v. 56, p. 1597-1604, 2007.

LOHI, O. et al. Recurrent Congenital Fibrosarcoma With Heart Metastases. **J Pediatr Hematol Oncol**. Tampere, v. 34, p. e202-e205, 2012.

LOGSDON, A.L. et al. Exposure to Green tea Extract Alters The Incidence of Specific Cyclophosphamide-induced Malformations. **Birth Defects Research B Dev Reprod Toxicol**. Emporia, v. 95(3), p. 231-237, 2012.

MADIGAN, J. et al. Chemokine scavenger D6 is expressed by trophoblasts and aids the survival of mouse embryos transferred into allogeneic recipients. **J Immunol**, v. 184, p. 3202–3212, 2010.

MAHABADY, M.K.; VARZI, H.N.; BAKHTIARI, E. The Teratogenicity of cyclophosphamide Skeletal System and neural Tube of fetal mice. **World Applied Sciences Journal**. Ahvaz, v. 16(6), p. 831-834, 2012.

MAMMON, K. et al. Expression of apoptosis-associated molecules in the fetoplacental unit of cyclophosphamide-treated mice. **Reproductive Toxicology**. Tel Aviv, v. 22, p. 774-782, 2006.

MANASTER, I.; MANDELBOIM, O. The unique properties of uterine NK cells. **American Journal of Reproductive Immunology**. Jerusalem, v. 63, p. 434-444, 2010.

MANASTER, I.; MANDELBOIM, O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. **Placenta**. Jerusalem, v. 22, p. s60-s66, 2008.

MANASTER, I. et al. endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. **The Journal of immunology**. Jerusalem, v. 181, p. 1869-1976, 2008.

MARTINS, J.P. et al. The role of P2X7 purinergic receptors in inflammatory and nociceptive changes accompanying cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in mice. **British Journal of Pharmacology**. Rio de Janeiro, v. 165, p. 183-196, 2012.

MCHUGH, S.B. et al. Amygdala and Ventral Hippocampus Contribute Differentially to Mechanisms of Fear and Anxiety. **Behavioral Neuroscience**. Oxford, v. 118, n. 63-78, 2004.

MEDINA, R.R. et al. New decision-tree model for defining the risk of reproductive failure. **American Journal of Reproductive Immunology**. Madrid, v. 70, p. 59-68, 2013.

MIRKES, P.E. et al. Role of acrolein in cyclophosphamide teratogenicity in rat embryos in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Washington, v. 72, p. 281-291, 1984.

MOFFET-KING, A. Natural Killer Cells and Pregnancy. **Nature Reviews – Immunology**. Cambridge, v. 2, p. 656-663, 2002.

MOFFET, A.; COLUCCI, F. Uterine NK cells: active regulators at the maternal-fetal interface. **The Journal of Clinical Investigation**. Cambridge, v. 124, p. 1872-1879, 2014.

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

MONTEIRO, D.L.M. et al. Câncer de mama da gravidez e quimioterapia: revisão sistemática. **Revista da Associação Médica Brasileira**. Teresópolis, v. 59, p. 174-180, 2013.

MOREL, N. et al. Study of anti-müllerian hormone and its relation to the subsequent probability of pregnancy in 122 patients with systemic lupus eritematosus, exposed or not to cyclophosphamide. **J Clin Endocrinol Metab**. Paris, v. 98(9), p. 3785-3792, 2013.

MORETTA, L. et al. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. **Immunological Reviews**. Genova, v. 214, p. 219-228, 2006.

MUKHTAR, D.D.Y.; STEWART, I.L.; CROY, B.A. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial glands cells. **Journal of Reproductive Immunology**. Guelph, v. 15, p. 269-279, 2989.

MULÉ, J.J. et al. Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**. Bethesda, v. 26, p. 95-100, 1988.

NAFEES, S. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NF-kB/MAPK pathway. **Chemico-Biological Interactions**. Nova Deli, v. 231, p. 98-107, 2015.

NANCY, P. et al. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. **Science**. Nova lorque, v. 336, p. 1317–21, 2012.

NAIR, S.S. et al. Virgin coconut oil supplementation ameliorates cyclophosphamide induced systemic toxicity in mice. **Human and Experimental Toxicology**. Kerala, v. 2015, p. 1-8, 2015.

NAKAYAMA, M.M. et al. Polaprezinc attenuates cyclophosphamide-induced cystitis and related bladder pain in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**. Osaka, v. 127, p. 223-228, 2015.

KAKAJIMA, Y. et al. Successful treatment of a pregnant women with philadelphia cromossome-positive acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematolo**. Yokohama, v. 97, p. 427-429, 2013.

NAU, H. et al. Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of cyclophosphamide and some of its deuterated derivatives. **Mutation Research**. Berlin, v 95, p. 105-118, 1982.

NURROCHMAD, A. et al. Immunomodulatory Effects of Ethanolic Extract of *Thyphonium flagelliforme* (Lodd) Blume in Rats Induced by Cyclophosphamide. **Journal of Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. Yogiakarta, p. 1-6, 2015.

OLIVA, B.A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptom in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Frontiers in Immunology**. Stockholm, v. 8, article 290, 2012.

OSTENSEN, M.; FÖRGER, F. How safe are anti-rheumatic drugs during pregnancy? **Current opinion in Pharmacology**. Bern, v.1 3, p. 470-475, 2013.

PAFFARO JR., V.A. et al. Subset classification of Mouse Uterine Natural Killer Cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**. Campinas, v. 24, p. 479-488, 2003.

PAGNOUX, C.; MAHENDIRA, D.; LASKIN, C.A. Fertility and Pregnancy in Vasculitis. **Best Practice and research Clinical Rheumatology**. Toronto, v. 27, p. 79-94, 2013.

PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brains Research**. Alfenas, v. 215, p. 146-151, 2010.

PARR, E.L.; PARR, M.B.; YOUNG, J.D. Localization of a Pore-Forming (perforin) in granulated metrial gland cells. **Biology of reproduction**. Illinois, v. 37, p. 1327-1335, 1987.

PARR, E.L.; SZARY, A.; PARR, M.B. Measurement of Natural Killer Activity and target Cell Binding by Mouse Metrial Gland Cells Isolated by Enzymic or Mechanical Methods. **J. Reprod. Fert.** Carbondale, v. 88, p. 283-294, 1990.

PELL, S.; BULMER, D. The fine structure of the rat metrial gland in relation to the origin of the granulated cells. **J.Anat. Southampton**, v. 123, p. 687-696, 1977.

PEEL, S.; STEWART, I.J.; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. **Cell and Tissue Research**. Southampton, v. 233, p. 647-656, 1983.

PEREZ, C.A. et al. Primary mediastinal large b-cell lymphoma during pregnancy. **Case reports in hematology**. Miami, v. 2012, p. 1-3, 2012.

PERUSSIA, B.; CHEN, Y.; LOZA, M.J. Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. **Molecular Immunology**. Philadelphia, v. 42, p. 385-395, 2005.

PJINEBORG, R. et al. Uteroplacental Arterial Changes Related to Interstitial Trophoblast Migration in Early Human Pregnancy. **Placenta**. Leuven, v. 4, p. 397-414, 1983.

PIRVULESCU, C. et al. Breast Cancer during pregnancy: an interdisciplinary approach in our institution. **Breast Care**. Berlin, v. 7, p. 311-314, 2012.

PJINEBORG, R. VERCRUYSSSE, L.; HANSSENS, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. **Placenta**. Leuven, v. 27, p. 939-958, 2006.

PITMAN, H. et al. Altered expression of interleukin-6 and interleukin-8 and their receptors in decidua of women with sporadic miscarriage. **Human reproduction**. Newcastle. v. .28, p. 2075-2086, 2013.

POLLAK, Y.; YIRMYIA, R. Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for 'depression due to a general medical condition', immunotherapy and antidepressive treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. Jerusalém, v. 5, p .389-399, 2002.

RAJAGOPALAN, S. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction. **Cellular and Molecular Immunology**. Rockville, v. 11, p. 460-466, 2014.

RAMATHAL, C.Y. Endometrial decidualization: of mice and men. **Semin Reprod Med**. Urbana, v. 28(1), p. 17-26, 2010.

RAMIREZ, K. et al. Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. **Brains, Behavior and Immunity**. Columbus, v. 46, p. 212-220, 2015.

RATSEP, M.T. et al. Uterine Natural Killer Cells: supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. **Reproduction**. Kingston, v. 147, p. r91-r102, 2015.

ROMAGNANI, C. et al. CD56^{bright}CD16⁻ Ig-like receptors NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56^{dim} NK cells upon activation. **The journal of immunology**. Berlin, v. 178, p. 4947-4955, 2007.

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

ROSE, J.A. et al. Peptidoglycan induces necrosis and regulates cytokine production in murine trophoblast stem cell. **Am J Reprod Immunol**. St. Louis, v. 66, p. 209-222, 2011.

SAKTHIVEL, S.K. et al. CXCL10 blockade protects mice from cyclophosphamide-induced cystitis. **Journal of Immune Based Therapies and Vaccines**. Columbia, v. 6, p. 1-14, 2008.

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

SÁNCHEZ, J. et al. Murine Granulated metrial gland cells are susceptible to Chlamidia psittaci infection in vivo. **Infection and Immunity**. Mursia, v. 64, p. 3897-3900, 1996.

SAVION, S. et al. Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 47, p. 118-127, 2002.

SAVION, S. et al. Potentiation of the maternal immune system may modify the apoptotic process in embryos exposed to developmental toxicants. **American Journal of reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 49, p. 30-41, 2003.

SAVION, S. et al. Effect of maternal immunopotential on apoptosis-associated molecules expression in teratogen-treated embryos. **American Journal of Reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 62, p. 400-411, 2009.

SCREEN, M. et al. Cathepsin proteases have distinct roles in trophoblast function and vascular remodeling. **Development and Disease**. Cambridge, v. 135, p. 3311-3320, 2008.

SEAMAN, W.E. et al. Suppression of natural killing in vivo by monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Clinical Investigation**. San Francisco, v. 69, p. 876-888, 1982.

SKATULLA, L.M. et al. Pre-eclampsia following chemotherapy for breast cancer during pregnancy: case report and review of the literature. **Ach Gynecol Obstet**. Neu-iseburg, v. 286, p. 89-92, 2012.

SIEGERS, R. et al. Cognitive impact of cytotoxic agents in mice. **Psychopharmacology**. Amsterdã, v. 232, p. 17-37, 2015.

SLOTT, V.L.; HALES, B.F. Sodium-2-mercaptoetane sulfonate against cyclophosphamide-induced teratogenicity in rats. **Toxicology and applied Pharmacology**. Montreal, v. 82, p. 80-86, 1986.

SLOTT, V.L.; HALES, B.F. Role of the 4-hydroxy intermediate in the in vitro embryotoxicity of cyclophosphamide and dechlorocyclophosphamide. **Toxicology and applied Pharmacology**. Montreal, v. 92, p. 170-178, 1988.

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

SOJKA, D.K. et al. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. **Seminars in Immunology**. St. Louis, v. 26, p. 127-131, 2014.

SOLATI, J. et al. Inverse effects of lipopolysaccharides on anxiety in pregnant mice and their offspring. **Physiology and Behavior**. Erlanger, v. 139, p. 369-374, 2015.

SPIELMAN, H. et al. Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of cyclophosphamide and some of its deuterated derivatives. **Mutation Research**. Berlim, v. 95, p. 105-118, 1982.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**. Paris, v. 85, p. 367-360, 1985

STEWART, I. et al. An investigation into the differentiation of granulated metrial gland cells in the early pregnant mouse uterus. **J. Anat. Southampton**, v. 137, p. 85-93, 1983.

SUN, J.C.; BEILKE, J.N.; LANIER, L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. **Nature**. San Francisco, v. 457 (7229), p. 557-561, 2009.

SUN, M. et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. **Stem Cell Research and Therapy**. Beijing, v. 4:80, 2013.

TAGLIANI, E. ET AL. Coordinate regulation of tissue macrophage and dendritic cell population dynamics by CSF-1. **J. Exp. Med.** Nova Iorque, v. 208, p. 1901–16, 2011.

TAKASHIMA, A. et al. Uterine Natural Killer Cells Severely Decrease in Number at Gestational Day 6 in Mice. **Biology of Reproduction**. Chiba, v. 89, p. 1-9, 2013.]

TAKEHARA, Y. et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cell on damaged ovarian function. **Laboratory Investigation**. Tokyo, v. 93, p. 181-193, 2013.

TANG, A.W. et al. Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. **Hum Reprod**, v. 26, p. 1971–1980, 2011.

TAYADE, C. et al. Differential transcription of Eomes and t-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**. Guelph, v. 78, p. 1347-1355, 2005.

TAYADE, C. et al. Genetic Deletion of Placenta Growth Factor in Mice Alters Uterine NK Cells. **The Journal of Immunology**. Guelph, v. 178, p. 4267-4275, 2007.

THIERRY, B. et al. The tail suspension test: Ethical considerations. **Psychopharmacology**. Paris, v. 90, p. 284-285, 1986.

TODER, V. et al. Teratogen-induced apoptosis may be affected by immunopotential. **Journal of Reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 30, p. 173-185, 1996.

TORCHINSKY, A. et al. MHC-associated immunopotential affects the embryo response to teratogens. **Clin Exp Immunol**. Tel Aviv, v. 98, p. 313-319, 1994.

TORCHINSKY, A. et al. TNF- α Protects Embryos Exposed to Developmental Toxicants. **American Journal of Reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 49, p. 159-168, 2002.

TORCHINSKY, A. et al. NF- κ B DNA-binding activity in embryos responding to a teratogen, cyclophosphamide. **BMC Developmental Biology**. Tel Aviv, v. 2, p. 1-11, 2005.

TORCHINSKY, A. et al. Maternal Immunopotential affects caspase activation and NF- κ B DNA binding activity in embryos responding to an embryopathic stress. **American Journal of Reproductive Immunology**. Tel Aviv, v. 55, p. 36-44, 2006.

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

VAN DEL HUEVEL, M.J. et al. A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **American Journal Of Reproductive Immunology**. Kingston, v. 54, p. 322-331, 2005.

RANGO, U.V. et al. Apoptosis of Extravillous Trophoblast Veels Limits the Trophoblast Invasion in Uterine but not in Tubal Pregnancy during first trimester. **Placenta**. Aachen, v. 24, p. 929-940, 2003.

VERA, P.L. et al. Cyclophosphamide-Induced Cystitis Increases Bladder CXCR4 Expression and CXCR4-Macrophage Migration Inhibitory Factor Association. **Plos One**. Bay Pines, v. 3, p. e3898 (12 pages), 2008.

VERTES, R.P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. **Synapse**. Boca Raton, v. 51, p. 32-58, 2004.

VOSSHENRICH, C.A.J. et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. **Nature Immunology**. Paris, v. 7, p. 1217-1224, 1343, 2006.

WANG, C. et al. Granulated Metrial Gland Cells in the Murine Uterus: Localization Kinetics, and the functional tole in Angiogenesis during pregnancy. **Microscopy Research and Technique**. Osaka, v. 60, p. 420-429, 2003.

WHITELAW, P.F., CROY, B.A. Granmulated Lymphocytes of Pregnancy. **Placenta**. Guelph, v. 17, p. 533-543, 1996.

WIKIEL, M.E.S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor with or without stem cell factor extends time to premature ovarian insufficiency in female mice treated with alkylating chemotherapy. **Reproductive Biology**. Pittsburg, v. 99, p. 2045-2054, 2013.

WOOD, L.J.; WEYMMAN, K. Inflammation and neural signaling: etiologic mechanisms of the cancer treatment-related symptom cluster. **Current Opinion Supportive and Palliative Care**. Boston, v. 7, p. 54-59, 2013.

YADI, H. et al. Unique Receptors Repertoire in Mouse Uterine NK Cells. **The Journal of Immunology**. Cambridge, v. 181, p. 6140-6147, 2008.

YANG, M. et al. Cyclophosphamide impairs hippocampus-dependent learning and memory in adult mice: Possible involvement of hippocampal neurogenesis in chemotherapy-induced memory deficits. **Neurobiology of Learning and Memory**. Gwangju, v. 93, p. 487-494, 2010.

YOKOTA, M. et al. Role of NKp46 Expression in Cytokine Production by CD56-Positive NK Cells, in the Peripheral Blood and the Uterine Mesometrium. **American Journal of Reproductive Immunology**. Aomori, v. 69, p. 202-211, 2013.

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

YURIDULLAH, r. et al. Expression of fractalkine and fractalkine receptor in urinary bladder after cyclophosphamide (CYP)-induced cystitis. **Anatomic Neuroscience**. Burlington, v. 127, p. 380-389, 2006.

ZALGEVICIENE, V. et al. The effect of nanoparticles in rats during critical periods of pregnancy. **Medicina (Kaunas)**. Vilnius, v. 48, p. 256-264, 2012.

ZAVAN, B. et al. Immunocytochemical Studies of Adhesion Molecules on Mouse UNK Cells and Their Extracellular Matrix Ligands During Mouse Pregnancy. **The Anatomical Record**. Alfenas, v. 293, p. 1081-1088, 2010.

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

ZHANG, J. et al. Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period os spiral arterial modification in mice. **Biology Of Reproduction**. Kingston, v. 79, p .450-458, 2008.

ZHANG, J. et al. Natural Killer Cell Triggered Vascular Transformation: Maternal Care Before Birth? **Cell Mol Immunol**. Kingston, v. 8(1), p. 1-11, 2010.

ZHENG, L.M. et al. Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. **The FASEB Journal**. New York, v. 5, p. 79-85, 1991.

