

Ministério da Educação
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

ÉRIKA PASQUA TAVARES

***ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO
PRÉVIO COM DANAZOL***

Alfenas - MG
Maio – 2011

ÉRIKA PASQUA TAVARES

***ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO
PRÉVIO COM DANAZOL***

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

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Alfenas - MG

Maio – 2011

ÉRIKA PASQUA TAVARES

***ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS
DA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO
PRÉVIO COM DANAZOL***

A Banca Examinadora abaixo assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas

Aprovada em: ____/____/____

Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Assinatura:

Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico ao meu filho Lucas e aos meus pais Luiz e Sônia pela paciência nestes dois anos; ao meu irmão André Luiz, modelo de serenidade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades da vida...

À Universidade Federal de Alfenas, por possibilitar minha graduação e mestrado.

Ao Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, através de seu coordenador, professor Dr. Alexandre Giusti Paiva, pelas oportunidades e incentivos à pós-graduação.

Ao prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior, pela experiência e dedicação, exemplo de competência e amor à ciência, revelando-me o significado de ser “altruista”.

À profa. Dra. Andréa Molica do Amarante Paffaro, pelo auxílio durante a realização da pesquisa.

Aos alunos de Iniciação Científica: Évila da Silva Lopes Salles e Patrícia Naiara Tame Lima pela contribuição imprescindível para a conclusão das atividades práticas.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa: Andréa Aparecida dos Santos Mendonça, Fernando Ponciano e Vanuza Aparecida dos Reis, pela atenção e disponibilidade no laboratório.

Aos meus colegas de mestrado Bruno Zavan, Kamila Leite Rodrigues, Daniel Antero de Almeida Gaudino, Anna Cláudia Guimarães Freire, Cláudia de Souza Ferreira, Paula Comune Pennacchi, Mariângela Rodrigues, Luciana Costa Teodoro, Michael Brian Santiago e Ana Laura de Oliveira Carvalho pela companhia nas disciplinas cursadas e nas atividades de laboratório.

À bibliotecária Fátima dos Reis Goyatá pelas orientações quanto às normas técnicas para elaboração da dissertação.

À CAPES e FAPEMIG, pelos recursos financeiros investidos nesta pesquisa.

Ao supervisor do campus de Varginha – UNIFENAS e coordenador do Curso de Odontologia, prof. Luiz Antônio Sartori, pela amizade, compreensão e incentivo ao meu crescimento profissional.

Aos professores, funcionários e acadêmicos do curso de Odontologia da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Varginha, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Minha eterna gratidão.

*“A expectativa dá mais valor às boas coisas da vida.
O céu não seria o céu se soubéssemos como ele é.”*

(Goethe)

RESUMO

Danazol, um andrógeno sintético, desenvolvido em 1970 para o tratamento da endometriose, tem aplicação controversa no pré-tratamento de mulheres com infertilidade sem causa aparente, abortos recorrentes e que seriam submetidas à fertilização com transferência de embrião. O conhecimento sobre a atuação deste medicamento sobre a incidência de células uNK, morfologia uterina e funções cognitivas após sua administração ainda são muito fragmentados e não conclusivos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos das diferentes concentrações do danazol no comportamento de camundongos prenhes, bem como, as possíveis alterações na implantação, viabilidade, perda embrionária, morfologia do útero e incidência dos subtipos de células uNK reativos para lectina DBA. Foram utilizadas noventa e três fêmeas da linhagem Swiss, obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, tratadas durante 14 dias por meio de gavagem com água destilada + tween 1% (grupo controle) e com água destilada + tween 1% + danazol nas concentrações de 0,75; 7,5; ou 75 mg/kg. O tratamento nos animais foi suspenso por 4 dias e após este prazo as fêmeas foram acasaladas com os machos. O dia em que foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado o 1º dia de gestação. Os testes comportamentais foram realizados e os animais foram sacrificados no 6º, 8º, 10º, 12º e 15º dia de gestação (ddg). Os resultados obtidos mostraram que danazol na dosagem de 0,75 mg/Kg apresentou efeito ansiogênico em camundongos e diminuiu a retenção de memória de curto prazo no 10º ddg. Na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento da retenção de memória a curto prazo e estado equivalente ao depressivo. A diminuição do tempo de exploração global, à medida que a concentração do hormônio foi aumentada sugere efeito dose dependente de danazol no estabelecimento de estado de sonolência e apatia em camundongos no 10º ddg. Danazol provocou atraso no período para sucesso da cópula, no entanto, aumentou a taxa de prenhez sem reduzir o número de corpus lúteos em todas as dosagens utilizadas. Nos camundongos tratados com a dosagem 7,5 mg/Kg de danazol foram observadas, a partir do 10º ddg, muitas células grandes e de morfologia equivalente às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos que nutrem a decídua e o embrião, o que sugere que está droga aumenta a invasividade do trofoblasto a partir do período médio da prenhez.

Danazol na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento no número de células uNK, enquanto dosagens menores (0,75 mg/Kg) e maiores (75 mg/Kg) causaram diminuição neste número, demonstrando o efeito dose dependente de danazol no número de células uNK. A análise dos diferentes subtipos de uNK no útero mostrou que danazol aumenta a migração destas células, podendo prejudicar a proliferação celular em doses elevadas e acelerar a diferenciação celular em áreas próximas ao embrião. As maiores alterações relacionadas à ansiedade e memória observadas no 10º ddg, associadas às alterações morfológicas nos sítios de implantação embrionária e aumento na proliferação de células natural killer uterinas também neste período, demonstram a integração entre sistemas nervoso, endócrino e imunológico durante a prenhez e a ação dose-dependente de danazol modulando as respostas destes sistemas.

Palavras-chave: Danazol, reprodução, células natural killer uterinas, testes comportamentais

ABSTRACT

Danazol, a synthetic androgen, developed in 1970 for the treatment of endometriosis, has a controversial application on the pre-treatment of women with unexplained infertility, recurrent miscarriage, and the ones that would undergo fertilization with embryo transfer. The knowledge about the way this compound works after its administration on the incidence of uNK cells, uterine morphology and cognitive functions is still incomplete and inconclusive. Our objectives were to evaluate the effects of different concentrations of danazol on the behavior of pregnant mice, as well as possible changes in implantation, viability, embryonic loss, morphology of the uterus and the incidence of DBA lectin-reactive uNK cell subtype. Ninety-three Swiss female mice from Universidade Federal de Alfenas vivarium were treated for 14 days by gavage with either distilled water + 1% Tween (control) or distilled water + 1% Tween + 0.75, 7.5 or 75 mg/kg of danazol. Females were mated with males after suspension of treatment during four days. Day 1 of gestation was established as the day when the presence of vaginal plug was detected. Behavioral tests were performed and the animals were sacrificed at 6th, 8th, 10th, 12th and 15th gestation days (gd). The data showed that 0.75 mg/kg of danazol caused an anxiogenic effect on mice and decreased the retention of short-term memory in the 10th gd. 7.5 mg/kg of this drug increased the retention of short-term memory and developed a depression-like state on the animals. The fact that gradual increase on hormone concentration caused gradual decrease on the global exploration time suggests a dose-dependent effect of danazol on establishing a state of somnolence and apathy in mice in the 10th ddg. Danazol caused a delay on time of successful mating, however, it increased the rate of pregnancy without reducing the number of corpus luteum in all dosages used. In mice treated with 7.5 mg/kg of danazol, many large cells with a trophoblast-like morphology were observed around vessels that nourish the decidua and the embryo starting at 10th gd, what suggests that this drug increases the invasiveness of the trophoblast starting in the middle period of pregnancy. 7.5 mg/kg of danazol increased the number of uNK cells, whereas the lowest (0.75 mg/ kg) and the highest (75 mg / kg) doses caused a decrease in this number, demonstrating a dose dependent effect of danazol on the number of uNK cells. The analysis of different subtypes of uNK cells in the uterus showed that

danazol increases the migration of these cells and can also impair cell proliferation on higher doses. It also suggests that danazol can stimulate cell differentiation in areas close to the embryo. The major changes related to anxiety and memory observed in the 10th gd, associated with morphological changes in the sites of embryo implantation and increase in proliferation of uterine natural killer cells in this period, demonstrate the integration between the nervous, endocrine and immune systems during pregnancy and the dose-dependent action of danazol in the modulation of these systems.

Key words: Danazol, reproduction, uterine natural killer cells, behavioral tests

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural de danazol.....	30
Figura 2 - Aparatos utilizados para os testes comportamentais.....	41
Figura 3 - Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10 ^o ddg e áreas 1 (A1), 2 (A2) e 3 (A3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células uNK.....	46
Figura 4 - Imagens macroscópicas de úteros de camundongos no 10 ^o , 12 ^o e 15 ^o ddg.....	58
Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10 ^o ddg.....	62
Figura 6 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 6 ^o ddg.....	64
Figura 7 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 8 ^o ddg.....	67
Figura 8 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 10 ^o ddg.....	68
Figura 9 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 12 ^o ddg.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.....	48
Gráfico 2 - Tempo de Permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.....	49
Gráfico 3 - Tempo de Permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.....	50
Gráfico 4 - Tempo de Permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.....	51
Gráfico 5 - Índice de Reconhecimento em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.....	52
Gráfico 6 - Tempo de Exploração Global em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.....	53
Gráfico 7 - Médias de tempo em que os animais permaneceram estáticos em experimento de nado forçado nos diferentes grupos experimentais.....	55
Gráfico 8 - Médias de tempo em que os animais permaneceram estáticos em experimento de nado forçado, nos diferentes grupos experimentais e dias de gestação.....	55
Gráfico 9 - Média das taxas de implantação total em todos os grupos experimentais.....	59
Gráfico 10 - Média das taxas de viabilidade embrionária em todos os grupos experimentais.	60
Gráfico 11 - Média das taxas de perda embrionária nos grupos experimentais nos dias de gestação analisados.....	60
Gráfico 12 - Representação da média total de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.....	70
Gráfico 13 - Representação da distribuição na Área 1 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.....	73
Gráfico 14 - Representação da distribuição na Área 2 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.....	73
Gráfico 15 - Representação da distribuição na Área 3 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais, número de animais e tratamentos realizados.....	37
Tabela 2 - Grupos experimentais, número de animais e dias de gestação.....	38
Tabela 3 - Grupos experimentais, número de animais e dias de gestação utilizados para análise estereológica.....	45
Tabela 4 - Estudo da fertilidade.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA	- Análise de variância
AT	- Área teste
CCL4	- Quimiocina (C-C motif) ligante 4
CD	- Cluster de diferenciação
DBA	- Dolichos Biflorus Agglutinin
ddg	- Dia de gestação
DIC	- Delineamento inteiramente casualizado
EG	- Exploração global
ERβ1	- Receptor para estrógeno β 1
EVTs	- Trofoblasto extraviloso
FLT1	- Tirosina-quinase relacionada ao gene fms
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GnRH	- Hormônio liberador de gonadotrofina
GR	- Receptor para glicocorticóide
hCG	- Gonadotrofina coriônica humana
HLA-C	- Antígeno leucocitário humano C
HLA-E	- Antígeno leucocitário humano E
HLA-G	- Antígeno leucocitário humano G
I	- Taxa de implantação
IL-10	- Interleucina-10
IL-13	- Interleucina-13
IL-15	- Interleucina-15
INF-γ	- Interferon-gama
I_R	- Índice de reconhecimento
IVF	- Fertilização
IVT-ET	- Fertilização e transferência de embriões
Ly49	- Receptor tipo lectina subfamília A
M-CSF	- Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
MHC-1	- Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MIP-1β	- Proteína inflamatória de macrófago - 1 β

MLAp	- Agregado linfóide mesometrial da gestação
MMPs	- Matriz-metaloproteinases
MR	- Receptor de manose
mRNA	- RNA mensageiro
NK	- Células natural killer
NKp46	- Proteína relacionada p46 às células natural killer
NL	- Número de corpos lúteos
P	- Taxa de perda embrionária
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PC	- Prenhez confirmada
PIGF	- Fator de crescimento da placenta
pNK	- Célula natural killer periférica
R	- Reconhecimento
RNA	- Ácido ribonucleico
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
sFLT1	- Receptor de FLT1
SR	- Número de sítios em reabsorção
SV	- Número de sítios viáveis
T	- Teste
TGF-β1	- Fator de crescimento transformante-β1
Th1	- Linfócito T auxiliar 1
Thy-1	- Antígeno de superfície celular Thy-1
TIMPs	- Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF	- Fator de necrose tumoral
TP	- Taxa de prenhez
TV	- Tampão vaginal
uNK	- Células natural killer uterinas
V	- Taxa de viabilidade embrionária
VCAM-1	- Molécula de adesão celular vascular
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-C	- Fator de crescimento endotelial vascular C

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Células Natural Killer Uterinas	19
2.2	Janela de Implantação	26
2.3	Invasão Trofoblástica	28
2.4	Danazol	30
2.5	Neuroimunoendocrinologia	32
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivos Gerais	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Animais	37
4.2	Análises Comportamentais	38
4.2.1	Análise de Ansiedade pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	39
4.2.2	Análise de Memória de Reconhecimento de Objetos.....	39
4.2.3	Análise de Depressão pelo Teste de Nado Forçado.....	40
4.3	Análise da Fertilidade	41
4.3.1	Quantificação dos Corpos Lúteos, Sítios de Implantação Embrionária e Análise das Taxas de Implantação, Viabilidade e Perda Embrionária.....	42
4.4.	Análise Morfológica e Citoquímica	43
4.4.1	Processamento para Embebição em Parafina.....	43
4.4.2	Citoquímica com Lectina DBA (Dolichos Biflorus Agglutinin).....	43
4.5	Análise Estereológica em Microscopia Fotônica	45
4.5.1	Amostragem	45
4.5.2	Análise Estereológica.....	46
4.6	Análise Estatística	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
	APÊNDICE	93
	ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

A gestação, do ponto de vista imunológico, somente é possível porque uma intrincada rede imunorregulatória é disparada com o objetivo único de desenvolver um estado de tolerância materno-fetal e permitir a implantação e manutenção do concepto até que haja condições de sobrevivência fora da cavidade uterina.

Entre os fatores envolvidos nessa complexa rede imunorregulatória para a tolerância e regulação do desenvolvimento fetal e formação da placenta, destacam-se: a influência hormonal sobre o sistema imune materno, o reconhecimento das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade paterno (expressas pelo embrião), as citocinas liberadas no meio uterino, o controle da citotoxicidade direta das células natural killer uterinas (uNK) e atividade das células T regulatórias.

As uNK são assim chamadas, pois apresentam características semelhantes às células natural killer periféricas, no entanto, são específicas do ambiente uterino, pois exibem características peculiares como ausência de citotoxicidade e secreção de interferon-gama (INF- γ), além de outros fatores que auxiliam na manutenção da homeostase uterina durante a gestação.

Em camundongos, as células uNK proliferam-se a partir do quinto dia de gestação e se diferenciam em células grandes e com muitos grânulos citoplasmáticos, semelhantes às NK ativadas de outros órgãos. Estas células se distribuem no endométrio da região mesometrial desde regiões mais distantes, com uNK mais imaturas, até regiões mais próximas ao embrião, ricas em uNK diferenciadas e senescentes. Neste ambiente, podem ser encontrados quatro subtipos de uNK reativos para lectina *Dolichos Biflorus agglutinin* (DBA), único marcador seletivo para as uNK de camundongos, que caracteriza as formas de diferenciação destas células.

A eficiência na marcação das células uNK, com especificidade comparável à de um anticorpo, se deve à expressão de N-acetil-D-galactosamina apenas nas NK do útero durante a gestação de camundongos, não reagindo com células NK de outros órgãos ou outras espécies.

Entretanto, o exato papel das células natural killer uterinas durante os vários estágios da gestação ainda não está totalmente elucidado. Outro ponto

importante em debate, refere-se às influências da alteração no número e maturação das células uNK na infertilidade em modelos experimentais e humanos.

De todas as gestações detectadas clinicamente em humanos, aproximadamente 10% a 15% culminam em aborto durante o primeiro trimestre. Embora em grande parte sejam esporádicos, cerca de 2 a 5% tratam-se de abortos recorrentes. As causas de abortos recorrentes são classificadas como sendo genéticas, endocrinológicas, anatômicas, imunológicas, microbiológicas ou ambientais. Aproximadamente 50% dos casos dos abortos recorrentes têm causa desconhecida, mas tem sido postulado que uma proporção de 80% dessas perdas recorrentes seja devido a fatores imunes.

Danazol, um andrógeno sintético, foi desenvolvido em 1970 para o tratamento da endometriose. É também indicado para tratamento de doença fibrocística de mama e como profilaxia no angioedema hereditário. Sua aplicação no pré-tratamento em mulheres com infertilidade sem causa aparente, abortos recorrentes e que seriam submetidas à fertilização *in vitro* com transferência de embrião, tem sido discutida na literatura. No Brasil, ainda é escassa a utilização de danazol, até em casos de tratamento da endometriose.

Em pacientes com repetidas falhas nos procedimentos de fertilização com transferência de embrião, observa-se um aumento na citotoxicidade natural das células natural killer uterinas, o que também pode ser observado em mulheres com aborto recorrente.

Um grande desafio envolvendo a fisiologia da reprodução é esclarecer os processos de interação entre o embrião e o endométrio durante o início da implantação e placentação e como o ambiente uterino participa destes eventos controlados pelo sistema endócrino durante a gestação.

Atuando no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, danazol impede a liberação de gonadotrofinas e liga-se, em uma relação dose-dependente, aos receptores de estrógeno e progesterona nos órgãos alvo.

Em mulheres com infertilidade inexplicada, o uso de danazol, modulando este microambiente uterino, alteraria o recrutamento e maturação das células uNK, tornando-se uma alternativa para os tratamentos em reprodução. Apesar de todo conhecimento a respeito de danazol, suas aplicações e efeitos colaterais, o conhecimento sobre a atuação deste medicamento na incidência de células uNK,

morfologia uterina e funções cognitivas após sua administração ainda é muito fragmentado e não conclusivo.

Em função da conhecida integração dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, foi proposto o estudo do efeito do tratamento prévio com danazol na implantação, viabilidade, perda embrionária, morfologia uterina e incidência dos subtipos de uNK DBA reativas, concomitantemente à análise comportamental nos parâmetros relacionados à depressão, ansiedade e memória, com o objetivo de analisar nossos resultados sob a visão da neuroimunoendocrinologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células Natural Killer Uterinas

As células natural killer (NK), linfócitos derivados da medula óssea, são um importante componente com atividade citotóxica na resposta imunológica não mediada através da pré-sensibilização por antígenos, atuando na via da resposta imune inata (TRINCHINERI, 1989). Estas células presentes no sangue, em órgãos linfóides e não linfóides originam-se da célula progenitora $CD\ 34^+ IL-2R\beta-chain^+$ (KALKUNTE et al., 2008). As células natural killer periféricas (pNK) compreendem aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos do sangue periférico (COLUCCI; CALIGIURI; DiSANTO, 2003). Kirwan e Burshtyn (2006) descrevem as NK como importantes componentes da resistência inata contra vírus, bactérias, certos parasitas e tumores, usando grânulos citoplasmáticos citolíticos e produção de citocinas inflamatórias para mediar suas funções efetoras. Segundo Smyth et al. (2005), evidências atuais mostraram que suas funções vão muito além da sua conhecida capacidade citotóxica. As células produzem citocinas que interagem diretamente com outras células do sistema imune, tais como as células dendríticas, participando da regulação do sistema imune adaptativo.

As células NK foram originalmente descritas como uma população homogênea de linfócitos (KIESSLING; KLEIN; WIGZELL, 1975). Posteriormente foi caracterizado que as células NK do sangue periférico de humanos poderiam ser divididas em dois subtipos baseados na expressão de CD56 e CD16 (LANIER et al., 1986). O subtipo predominante no sangue periférico, correspondendo à aproximadamente 90%, são as células $CD56^{dim} CD16^+$, sendo conhecidas pela sua alta citotoxicidade e baixa secreção de $INF-\gamma$. Já as células $CD56^{bright} CD16^-$, perfazem os outros 10% da população de células NK e são produtoras de muitas citocinas incluindo $INF-\gamma$, TNF, IL-10, IL-13 e GM-CSF sob o estímulo de citocinas pró-inflamatórias, porém, podem adquirir citotoxicidade após ativação prolongada (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; KALKUNTE et al., 2008). Considerando-se o trato reprodutivo feminino, as células $CD56^{bright} CD16^{dim}$ são encontradas nas

regiões do endométrio, cervix e tuba uterina. No ectocervix e vagina, as células NK expressam CD56^{dim} CD16^{bright} (MSELLE et al., 2007).

No útero gestante dos animais com placentação do tipo hemocorial, ocorre uma migração e acúmulo transitório de células natural killer (NK), cuja atuação na gestação não está totalmente elucidada. Estas células NK do ambiente uterino (uNK) apresentam comportamento distinto daquelas encontradas no sangue circulante (cNK), constituindo uma sub-população das células NK com expressão gênica específica ditada pelo ambiente uterino gestante (FERRAZ, 2006).

Bulmer e Lash (2005) relataram a presença de células NK no útero de mulheres não gestantes e gestantes. Segundo estes autores, o número de células uNK variava em relação ao ciclo menstrual, com poucas células na fase proliferativa, aumento durante a fase secretória, retornando aos níveis basais durante a menstruação. Kitaya et al. (2007) observaram que com o sucesso da implantação, a população de células NK aumenta muito no primeiro trimestre da gestação, diminuindo ao final do segundo trimestre.

Em humanos, o aparecimento cíclico das células uNK no endométrio não-gestante sugere regulação hormonal (BOUTEILLER e PICCINNI, 2008). Várias observações indicam que a quantidade destas células varia paralelamente com os níveis de progesterona. Nas fases pré-ovulatória, proliferativa (folicular) do ciclo menstrual, poucas, pequenas e agranulares células uNK aparecem no endométrio. Seu número aumenta muito depois após a ovulação, sob influência dos níveis de progesterona. Na fase lútea, as células uNK proliferam rapidamente e possuem grânulos, sendo encontradas em contato com os vasos espiralados do endométrio. Dois dias antes da menstruação, quando os níveis de progesterona diminuem, as células uNK morrem (KING et al., 1998; MOFFETT-KING, 2002).

No início da gestação ocorrem importantes alterações nas células uterinas. Os fibroblastos endometriais se diferenciam em células com características epitelióides que passam inclusive a se unirem por junções. Este fenômeno é denominado decidualização (ABRAHAMSOHN, 1983). À decidualização atribuem-se funções de conter a invasividade trofoblástica (BEVILACQUA; FARIA; ABRAHAMSOHN, 1991; APLIN; GLASSER, 1994), manter a ancoragem do blastocisto no endométrio, promover a nutrição do embrião e produção de hormônios para a manutenção da gestação (ABRAHAMSOHN, 1983). Paschoaline (2009) relata que durante a decidualização ocorre alteração na expressão de

metaloproteases, citocinas, integrinas e complexos moleculares de histocompatibilidade.

Em uma área próxima aos vasos mesometriais, concomitantemente à decidualização, forma-se uma estrutura transitória que foi inicialmente e erroneamente caracterizada como glândula metrial. Esse erro na sua caracterização inicial ocorreu em função de seu estudo morfológico demonstrar células em microscopia fotônica com citoplasma repleto de grânulos PAS positivos (SMITH, 1966; LARKIN; FLICKINGER, 1969; PEEL; STEWART; BULMER, 1983). Em 1911, Ancel e Bouin (apud PELL, 1989), utilizaram o termo “glândula endócrina miometrial” para descrever esta estrutura que foi subsequenteiramente chamada de “glândula metrial” por Selye em 1935 (apud PELL, 1989) e as células que a constituíam foram inicialmente denominadas células granulosas da glândula metrial.

Ultraestruturalmente, os grânulos citoplasmáticos destas células são heterogêneos e eletrodensos (LARKIN e FLICKINGER, 1969; DICKSON e BULMER, 1971; PAFFARO JR et al., 2003) com morfologias semelhantes aos grânulos das células NK ativadas de ratos (BURKHARDT et al., 1990). Além disso, estudos imunocitoquímicos e imunoquímicos com as células granulosas da glândula metrial revelaram a presença de perforina nos grânulos intracitoplasmáticos destas células (PARR et al., 1987, 1990; ZHENG et al., 1991), expressão de CD45 (REDLINE e LU, 1989; PARR et al., 1990), Thy-1 (BERNARD et al., 1978; MUKHTAR et al., 1989; PARR et al., 1990), asialo-GM1 (MUKHTAR et al., 1989) e não expressão de marcadores de linfócitos T e B (WHITELAW e CROY, 1996). Após as observações da presença de perforina nos grânulos citoplasmáticos das células uNK, foi sugerida a importância destas células nos fenômenos imunológicos da reprodução (PARR et al., 1987, 1990, ZHENG, 1991). Tais estudos foram fundamentais para caracterização destas células como pertencentes à linhagem NK e estas passaram a ser denominadas na literatura como células natural killer uterinas (uNK).

A região da glândula metrial foi também renomeada por Croy (1999) que sugeriu a denominação de agregado linfóide mesometrial da gestação (MLAp) a esta estrutura, constituída essencialmente por células natural killer uterinas.

Em camundongos as células uNK aparecem por volta do 5º dia de gestação (ddg), coincidindo com o período de implantação do blastocisto e decidualização do endométrio. Nesse período essas células são raras, pequenas e não apresentam grânulos citoplasmáticos. No 6º ddg estes grânulos podem ser

notados. Estas células continuam proliferando-se, diferenciando-se e aumentando de tamanho no útero durante a gestação, podendo atingir até 50 μm de diâmetro e se distribuem no miométrio e endométrio decidualizado e não decidualizado da região mesometrial de cada sítio de implantação (STEWART; PEEL, 1981; PAFFARO JR. et al., 2003). As células uNK induzem a produção de interferon γ , perforina e outras moléculas, incluindo fatores angiogênicos (CROY et al., 2003^a; WU et al., 2006).

Corrêa da Silva (1997), para realização de estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus Musculus*) prenhes utilizou a lectina DBA (*Dolichos Biflorus Agglutinin*), que possui alta afinidade por glicoconjugados contendo N-acetil-D galactosamina presentes nas membranas celulares e ao redor dos grânulos das uNK. Paffaro Jr. et al. (2003), demonstraram que esta lectina possui especificidade na marcação das uNK, não reagindo com outras populações linfocitárias. Assim, distingui até mesmo as células uNK no 5º ddg quando começam a apresentar modificações nos carboidratos que são reconhecidos pela lectina *Dolichos Biflorus agglutinin* (DBA). Segundo estes últimos autores, a citoquímica de lectina DBA caracteriza quatro subtipos de células uNK a saber: o subtipo I de célula uNK é a sua forma mais imatura, esférica, pequena, como os linfócitos circulantes, medindo aproximadamente $9 \pm 3 \mu\text{m}$ de diâmetro e desprovidos de grânulos, com poucas organelas, núcleo circular com grande quantidade de cromatina condensada, fortemente positivos para lectina DBA em sua superfície. O subtipo II de uNK consiste em células maiores, com $13 \pm 2 \mu\text{m}$ de diâmetro, positivos em sua superfície à lectina DBA com poucos grânulos lisossomo secretores citoplasmáticos também apresentando reatividade à lectina DBA. Possui núcleo com uma cromatina mais condensada, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi evidentes. O subtipo III, a forma caracterizada como plenamente diferenciada e ativa, apresenta células ainda maiores, medindo 26 μm , com núcleo redondo eucromático, muitos grânulos densos, com forte reatividade à lectina DBA em sua superfície e grânulos. O subtipo IV, a forma senescente, possui diâmetro de 30 μm , com inúmeros grânulos positivos à lectina DBA, áreas citoplasmáticas eletrólucidas, provavelmente devido à extração do glicogênio, núcleo apresentando uma massa de cromatina condensada e irregular semelhante às células em apoptose, com vacúolos citoplasmáticos e reatividade descontínua da membrana celular para lectina DBA.

Procurando explicar a origem das células uNK no ambiente uterino em camundongos, Wang et al. (2003) verificaram que, enquanto os vasos sanguíneos de úteros não-prenhes foram negativos para a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), estes eram positivos no útero prenhe. Entretanto, tratamento com anticorpo contra VCAM-1, não diminuiu o número de células uNK. Além disso, mitoses de células uNK eram frequentemente observadas. Estes resultados sugerem que o aumento do número das células uNK durante a gestação resulta de proliferação local.

Em camundongos, as células NK são caracterizadas como CD3⁻ CD122⁺. No útero de camundongos as uNK que se concentram na decídua e no agregado linfóide mesometrial da prenhez, expressam receptores específicos como NKp46 e Ly49 e perdem a expressão de NK 1.1 e DX5. O repertório específico de receptores expressos pelas uNK de camundongos influencia a ativação destas células e seu potencial de adesão ao MHC (YADI et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que, analogamente aos receptores KIR expressos pelas uNK de humanos, os receptores da família Ly49 (*Killer cell lectin-like receptors*) de camundongos reconhecem e se ligam ao MHC-1 e esta associação possibilita a ativação ou inibição da atividade citotóxica (KING et al., 2000; TROWSDALE, 2001; RAULET; VANCE; McMAHON, 2001). Estas conclusões foram confirmadas por Yadi et al. (2008) que descreveram um distinto repertório de receptores Ly49 expressos pelas células CD3⁻ CD122⁺ NK 1.1⁻ DX5⁻.

Os receptores Ly49 são receptores lecitina tipo II, combinados a moléculas do MHC. A maioria dos receptores Ly49 são inibitórios, mas alguns tem potencial de ativação. Estes receptores ativatórios iniciam uma cascata bioquímica disparando a produção de citocinas e citotoxicidade (VAN DEN HEUVEL et al., 2005). A prenhez induz a expressão de receptores Ly49 inibitórios (CROY et al., 2003^a; CROY et al., 2003^b).

Wang et al. (2003) observaram o progressivo aumento em número e tamanho das células uNK com pico no dia 12-14 de gestação na decídua e no agregado linfóide mesometrial. Segundo estes autores, a formação de novos vasos era mais proeminente em torno do dia 8, com pico no 13^o dia de gestação. Além disso, relataram que as células uNK foram frequentemente localizadas próximas aos vasos sanguíneos e expressavam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sugerindo um possível papel indutor de angiogênese durante o desenvolvimento da

decídua e do agregado linfóide mesometrial. De acordo com Lash et al. (2006), as células uNK de humanos, roedores e porcos caracterizam-se por sua abundante transcrição de fatores angiogênicos, incluindo VEGF-C, fator de crescimento da placenta (PIGF), angiopoitina 1, angiopoitina 2 e TGF- β 1. Estudos *in vivo* e , realizados em ratos e camundongos por Hanna et al. (2006) demonstraram que a liberação de fatores angiogênicos depende de interações com receptores específicos das uNK.

Estudo recente realizado por Croy et al. (2010), procurou caracterizar esta abundante e transitória população de células NK, através do desenvolvimento de métodos de isolamento e cultura de células uNK, extração de RNA e citometria de fluxo. Com estas técnicas procurou-se identificar as propriedades angiogênicas especiais das células uNK e sua relação com alterações fisiológicas normais na circulação arterial uterina e geral, responsáveis pelo sucesso da gestação (CROY et al., 2010; BURKE et al., 2010).

É clara a influência de hormônios esteróides como progesterona e estrógeno, no recrutamento das células NK (DOSIOU; GIUDICE, 2005). A progesterona age estimulando a produção de MIP-1 β , que por sua vez influencia a migração das células NK para o útero (KITAYA et al., 2003). A progesterona também tem influência na produção de VEGF e na expressão de moléculas de adesão como a L-selectina e integrina α -4 (POPOVICI, KAO; GIUDICE, 2000; CHANTAKRU et al., 2003).

A migração dos linfócitos de órgãos linfóides para a circulação, seguindo para os tecidos, é orquestrada por uma série de interações entre o tecido específico que secreta quimiocina e seus receptores expressos por subtipos de linfócitos (CAMPBELL; BUTCHER, 2000). No útero de humanos, várias quimiocinas são produzidas principalmente pelas células decidualizadas, pelas células dos vasos sanguíneos do estroma, leucócitos deciduais e citotrofoblasto (RED-HORSE; DRAKE; FISHER, 2004). Dentre as quimiocinas encontradas, destaca-se a MIP - 1 β , também chamada CCL4 (MAURER; VON STEBUT, 2004). No útero, a MIP - 1 β tem como fonte as células do estroma e sua produção é estimulada pela progesterona (KITAYA et al., 2003).

King, Gardner e Loke (1996) estudando a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em leucócitos da mucosa uterina, não observaram nenhum destes receptores em macrófagos e nas células natural killer uterinas. Os

autores concluem que apesar da acumulação e sobrevivência das células uNK terem dependência hormonal, estes efeitos devem ser indiretos.

Borzychowski et al. (2003) também observaram ausência de expressão de alpha e beta-ER (receptores de estrógeno) através de RT-PCR em células NK isoladas do útero de camundongos. Entretanto, estudo realizado por Henderson et al. (2003) demonstraram que as células uNK expressam tanto mRNA quanto a proteína ER β 1 e GR (receptores para estrógeno do tipo β 1 e para glicocorticóides). Recente estudo realizado por Kuang et al. (2010), procuraram explicar a regulação hormonal das células natural killer uterinas no útero de camundongos no período pre-implantacional. Os resultados destes autores mostraram que as células precursoras das uNK ou seus específicos componentes de membrana devem ser recrutados pelo útero através da influência de estrógeno e/ou progesterona e seus efeitos podem ser completamente abolidos por antagonistas específicos de seus receptores nucleares (receptores para estrógeno e progesterona).

Tem sido demonstrado na literatura que a progesterona adere-se aos receptores das células do estroma uterino aumentando a secreção de IL-15 (LOKE; KING, 1995). IL-15 é um produto das células do estroma uterino tanto em humanos quanto em camundongos durante a decidualização (OKADA et al., 2000; DUNN; CRITCHLEY; KELLY, 2002; ARCK et al., 2007).

Estudo realizado por Keskin et al. (2007) mostraram que TGF β favorece a conversão de células NK periféricas (pNK) CD16⁺CD9⁻ em células CD16⁻CD9⁺ semelhantes às uNK. Os autores discutem que a decídua também contém células progenitores capazes de adquirirem o fenótipo das uNK. Pode-se concluir, portanto, que tanto as células CD16⁺ periféricas ou os progenitores da decídua, ou ambos, são os possíveis precursores das células uNK. Apesar das dúvidas existentes sobre os verdadeiros precursores das uNK, o estudo sugere que TGF β possui um importante papel influenciando o fenótipo das uNK.

Kane et al. (2009) demonstraram que a gonadotrofina coriônica (hCG), hormônio sintetizado pelo trofoblasto atua como um regulador da proliferação das uNK. A influência do hCG sobre as células uNK é mediada por um receptor de manose (MR, CD206). MR e hCG foram encontrados nos mesmos locais na superfície das uNK e a proliferação destas células não ocorreu quando foram incubadas com hCG-diglicosilado ou hCG intacto na presença de excesso de D-

Manose. Estas novas observações confirmam a relação entre hCG e as células NK durante a gravidez e podem ser o foco de futuras intervenções terapêuticas.

2.2 Janela de Implantação

A implantação é um processo complexo, onde um embrião semi-alogênico precisa ser aceito pelos tecidos maternos, invadindo-os para ter acesso a nutrientes, essenciais para sua sobrevivência e desenvolvimento. Para que isto aconteça é necessária uma extensa preparação e uma comunicação bidirecional entre o blastocisto e os tecidos endometriais (VAN MOURIK; MACKLON; HEIJNEN, 2009).

Na região endometrial, a preparação para a implantação é necessária, sendo chamada janela de implantação. Neste período, o útero é preparado para receber o blastocisto e observa-se a presença de células do sistema imune, citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e moléculas de adesão (KAMMERER; VON WOLFF; MARKERT, 2004; DIMITRIADIS et al., 2005). Conforme Sarafana et al. (2007), durante a gravidez, o sistema imunológico materno é ativo e funcional. Existem diversos mecanismos subjacentes à tolerância materna do feto que permitem a implantação e a gestação bem sucedida. A expressão de moléculas de HLA-G, HLA-E e HLA-C nas células do trofoblasto, o controle da atividade citolítica das NK através de receptores inibitórios, a expressão de proteínas reguladoras do complemento, a regulação do recrutamento de leucócitos e proliferação celular na interface materno-fetal e a supressão de linfócitos Th1 na decídua parecem ser constituintes essenciais do fenômeno de tolerância imunológica que ocorre entre o feto e a mãe durante a gestação.

Um endométrio funcional é necessário para o sucesso da implantação. Na fase proliferativa, mediada pelo estrogênio, a preparação acontece. Na fase secretória, a janela de implantação é estabelecida através da ação da progesterona sobre o endométrio preparado pelo estrogênio. A preparação do endométrio consiste na expressão de numerosos receptores e moléculas de adesão, além da produção de citocinas e outros mediadores. O processo de implantação engloba vários estágios distintos: aposição, adesão, penetração e invasão trofoblástica (JABBOUR et al., 2006).

Um passo importante para o estabelecimento da gestação é a decidualização, que é um processo no qual o endométrio sofre grandes alterações em sua morfologia, expressão e secreção de mediadores químicos que permitirão a implantação do blastocisto (KING, 2000). Em humanos, a decidualização acontece na ausência do embrião e se há falhas na implantação deste, a menstruação ocorre. O processo de decidualização é induzido em grande parte pela progesterona (GELLERSEN; BROSENS, 2003; BRAR et al., 1997).

O estabelecimento da janela de implantação está sob controle dos hormônios esteróides. Entretanto, esta regulação hormonal varia em diferentes espécies. Em camundongos e ratos, o estabelecimento da janela de implantação requer a presença de estrógeno e progesterona. Entretanto, estrógeno não é necessário em porcos e coelhos (KIMBER, 2005; DEY et al., 2004). Em humanos, segundo Jabbour et al.(2006), um endométrio preparado pelo estrógeno desenvolve-se com a ação da progesterona.

Segundo Aghajanova, Hamilton e Giudice (2008), o sucesso da implantação embrionária é um evento crucial para a reprodução humana natural e assistida. Na fertilização (IVF), falhas na implantação podem ocorrer devido a vários fatores, incluindo anormalidades cromossômicas e um desenvolvimento inapropriado do endométrio (LOKE; KING; BURROWS, 1995; SZCZYGIET; KURPISZ, 2003; VOULLAIRE et al., 2002; LEVI, et al., 2004). Sabe-se que embriões não conseguem implantar-se em um endométrio pouco maduro, e isto é a causa de baixas taxas de implantação em casos de transferência de embriões de boa qualidade (VALBUENA et al., 1999).

Deve-se ressaltar o papel das células uNK na produção de citocinas e outros componentes imunológicos que preparam o útero para a implantação. Em estudo realizado por Kuang et al. (2010) foi demonstrado que o precursor das células uNK ou seu componente específico é expresso dinamicamente no útero durante o período pre-implantacional, sobre a regulação de estrógeno e progesterona através de seus receptores nucleares. Os resultados destes autores demonstraram que a regulação hormonal antes da implantação do embrião é necessária para a migração de precursores de células uNK (ou seu componente específico) para o útero.

2.3 Invasão Trofoblástica

Em humanos, durante o primeiro trimestre da gestação, a placenta está em um processo de construção de sua arquitetura. A principal célula do estroma placentária, o trofoblasto, deve formar e ancorar pilares de tecido fetal (vilos), enquanto simultaneamente esculpe um ambiente de lacunas entre os vilos (espaço interviloso). Quando encontra seu caminho na decídua, próximo às artérias espiraladas maternas, estabelece-se uma importante “linha da vida” de vasos no interior das lacunas. O processo de invasão consiste na habilidade das células em degradar tecidos vizinhos, a matriz extra-celular. As células trofoblásticas são capazes de produzir matriz-metaloproteinases (MMPs) e outras proteases. Este método é similar àquele usado pelas células tumorais (FITZGERALD; POEHLMANN; MARKERT, 2006).

De acordo com Alves et al. (2003), durante o início da gravidez humana, os citotrofoblastos extravilosos invadem o útero e transformam as artérias espiraladas em grandes vasos de baixa resistência. A inadequada invasão das artérias espiraladas por estes trofoblastos extravilosos resulta em isquemia placentária e no desenvolvimento de complicações obstétricas como pre-eclâmpsia e a restrição do crescimento fetal intra-útero.

O sucesso da implantação em humanos é altamente dependente de uma coordenada diferenciação das células do estroma endometrial em células deciduais e das células trofoblásticas em sincitiotrofoblasto e citotrofoblasto extraviloso invasivo (EVTs) (GODBOLE et al., 2011). O citotrofoblasto extraviloso é importante porque é responsável pela ancoragem para o desenvolvimento do embrião e regula as alterações que ocorrem na circulação materno-fetal durante o início da gestação (PIJNENBORG, 1998; CHADDHA et al., 2004). Alterações neste processo de invasão está usualmente associada com perdas ou complicações gestacionais (McMASTER; ZHOU; FISHER, 2004; WELLS, 2007). Vários estudos com culturas celulares tem demonstrado que o citotrofoblasto extraviloso age invadindo a decídua, as artérias espiraladas e o epitélio glandular (HELIGE et al., 2008; MOSER et al., 2010). Os EVT's ativam seu potencial invasivo através da produção de altas quantidades de matriz-metaloproteinases (MMPs) (LIBRACH et al., 1991; STAUNRAM; SHALEV, 2005). Em adição, a decídua produz inibidores teciduais de

metaloproteinases (TIMPs) que antagonizam a atividade proteolítica das MMPs, criando uma barreira física e bioquímica que limita a invasão (DIMITRIADIS et al., 2005).

Estudos realizados por Albrecht et al. (2006), usando o babuíno como modelo de estudo, mostraram a supressão pelo estrógeno da invasão pelo trofoblasto extraviloso (EVT) das artérias espiraladas uterinas no primeiro trimestre da gestação. De acordo com Bonagura et al. (2008), os mecanismos e fatores que modulam e regulam a indução pelo estrógeno da invasão das artérias uterinas pelo EVT ainda não estão totalmente esclarecidos.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é expresso pelo EVT nos vilos de ancoragem e o citotrofoblasto liga-se ao fms-like (FLT1) expresso pelo endotélio vascular da placenta e pelas células do trofoblasto viloso e extraviloso (AHMED et al., 1995). VEGF pode ser sequestrado e inativado por um receptor de FLT1 (sFLT1), expresso pela placenta. Na preeclampsia, que está associada com rudimentar invasão vascular (BROSENS; ROBERTSON; DIXON, 1972), há baixa expressão de VEGF pelo EVT e alta expressão de SFLT1 pela placenta (ZHOU et al., 2002; LEVINE et al., 2004). Estes e outros estudos tem mostrado que VEGF tem papel importante em promover a migração do EVT e a invasão das artérias espiraladas (APLIN et al., 2000; ZHOU et al., 2002; ZHOU et al., 2003). Estrógeno aumenta a expressão de VEGF pelo epitélio glandular e células do estroma do útero de babuínos, ovelhas e ratos (NIKLAUS et al., 2003; ALBRECHT, 2003; REYNOLDS et al., 1998; CULLINAN-BOVE; KOOS, 1993). Em estudo realizado por Bonagura et al. (2008), foi demonstrado que a expressão de mRNA para VEGF pelo EVT placentária foi eliminada, e os níveis de sFLT1 (responsável pela bioavaliabilidade de VEGF) na veia uterina estavam aumentados em babuínos onde a invasão das artérias espiraladas uterinas estava diminuída com o aumento dos níveis de estrógeno no primeiro trimestre da gestação. Os autores concluíram que VEGF controla a diminuição da invasão das artérias espiraladas pelo EVT quando induzido pelo estrógeno. Resta considerar que os baixos níveis de estrógeno endógeno no início da gestação permitem normal invasão das artérias espiraladas pelo EVT e o aumento dos níveis de estrógeno com o avanço da gestação tem um importante papel fisiológico na regulação da extensão desta invasão.

2.4 Danazol

Danazol é um esteróide sintético derivado da etisterona. É um pó cristalino branco ou amarelo pálido, insolúvel em água e moderadamente solúvel em álcool. Apresenta-se quimicamente representado por 17 α -Pregna-2,4-dien-20-yno [2,3-*d*]-isoxazol-17-ol, com fórmula molecular C₂₂H₂₇NO₂ e peso molecular 337.46 (DANAZOL, 1996). A fórmula estrutural pode ser observada na Figura 1.

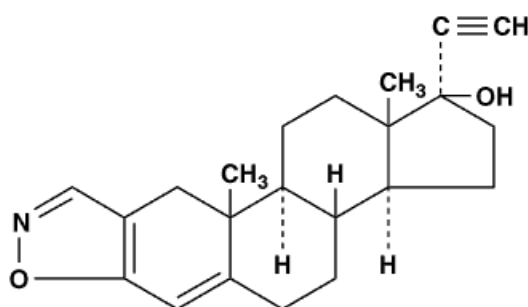


Figura 1 – Fórmula estrutural de danazol. Fonte: DANAZOL (1996)

De acordo com Dmowski (1990), danazol é um agente terapêutico usado no tratamento de endometriose e alguns tumores benignos de mama, diminuindo a liberação de gonadotrofinas e inibindo a adrenal através da supressão de várias enzimas. Também tem sido indicado para prevenção de angioedema hereditário (BORK; BYGUM; HARDT, 2008).

Vários estudos relatam que danazol melhora as condições imunológicas locais no útero, aderindo-se diretamente aos receptores para estrógeno e progesterona no tecido endometrial. Utilizado no pré-tratamento à fertilização e transferência de embriões (IVF-ET) tem sido eficaz, aumentando seu sucesso (DMOWSKI, 1990; OTA et al., 1996; KUSAKABE et al., 2007; TEI et al., 1998). Entretanto, pouco é conhecido sobre o mecanismo de atuação de danazol que se traduz em sua eficácia no aumento da fertilidade. Em pacientes com freqüentes falhas na IVF-ET existe um evidente aumento da citotoxicidade das células natural killer dentro do endométrio (FUKUI et al., 1999). Esta citotoxicidade aumentada foi também observada em pacientes com aborto recorrente (AOKI et al., 1995). Estudos em ratos com endometriose induzida têm mostrado que o efeito terapêutico de

danazol inibe o crescimento ectópico de tecidos uterinos, acompanhado pela normalização do número de células natural killer (MATSUBAYASHI et al., 1995).

Devido a sua pouca solubilidade em água e sua baixa biodisponibilidade, danazol é usualmente administrado em doses relativamente altas, em torno de 200 a 400 mg (HOOPER; EADIE; DICKINSON, 1991). Além disso, pela supressão da produção de esteróides pelo ovário causando baixos níveis de estrógeno e altas doses de andrógenos, muitos efeitos colaterais são observados, como: ganho de peso, virilismo, acne, hirsutismo e diminuição na mineralização óssea (DODIN et al., 1991; BADAWY; GHORAB; ADEYEYE, 1996). Barbieri e Ryan (1981) também relataram ganho de peso devido à sua atividade anabolizante/androgênica, bem como, metabolismo lipídico anormal, disfunção hepática, e trombose cerebral. Segundo Katsuki et al. (1998) danazol estimula a reabsorção óssea em ratos com endometriose. Devido aos intensos efeitos colaterais, alguns autores não indicam danazol para mulheres com infertilidade inexplicada (HUGHES; BROWN; TIFFIN, 2009). Entretanto, Brown, Pan e Hart (2010) revelaram a mesma eficácia de danazol na diminuição da dor relacionada à endometriose e com efeitos colaterais menores que os análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHAs) utilizados atualmente com mais freqüência no tratamento da endometriose.

Vários efeitos farmacológicos de danazol têm sido relatados, incluindo inibição da liberação de gonadotrofinas, inibição competitiva de enzimas esteroideogênicas, modulação de funções imunológicas e supressão de proliferação celular (FRANCHIMONT; CRAMILION, 1977; BARBIERI et al., 1977; ROSE et al., 1988; VIGANO et al., 1994).

Mukarami et al. (2006) mostraram que danazol inibe competitivamente a atividade da aromatase em experimento com cultura de células retiradas de pacientes com endometriose, submetidos a laparoscopia. O estudo também demonstrou que danazol não afeta o mRNA ou os níveis de aromatase, indicando a eficácia de aplicações locais de danazol nas lesões endometrióticas.

Em estudos *in vitro*, danazol exibe efeitos antiproliferativos nas células endometriais quando em cultura com monócitos do sangue periférico, na presença de estrógeno ou de proteínas da matriz extracelular (SURREY; HALME, 1992; NEGAMI; SASAKI; TOMINAGA, 1993). Foi demonstrado por Thomas et al. (2007) que danazol exibe uma forte habilidade para diminuir a proliferação de células

endoteliais induzidas por soro fetal bovino e alguns fatores de crescimento implicados na iniciação e progressão da angiogenese.

Danazol adere-se com diferentes afinidades aos receptores de hormônios esteróides incluindo glicocorticóides, progesterona, estrógeno e andrógenos (TAMAYA et al., 1984).

Musich, Behrman e Menon (1981) sugerem que os efeitos de danazol sobre os receptores de estrógeno tem mecanismo de ação nos tecidos alvo, dose (ou duração de tratamento) dependente. Baixas doses de danazol, mesmo que por períodos prolongados, não alteram significativamente o metabolismo e apresentam menores efeitos colaterais (De LEO et al., 1997). Entretanto, conforme estudos de Morgante et al. (1999), nestas doses menores (100 mg/kg/dia), danazol não se liga aos receptores de estrógeno, mas se liga estavelmente aos receptores para andrógenos e progesterona, diminuindo os efeitos do estrógeno, impedindo a proliferação dos tecidos endometrióticos e reduzindo a dor do paciente.

Estudo realizado por Kusakabe et al. (2007) demonstrou que o tratamento de camundongos com danazol provocou um aumento na expressão nos genes para Ly49A, Ly49C, integrina $\alpha 5$ e M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófago), no útero de camundongos do 1º ddg, sugerindo que a atuação de danazol na promoção da gravidez se deve ao recrutamento das células uNK. Takei, Brennan e Mager (1997) já haviam observado que o tratamento com danazol reforçava a expressão dos níveis uterinos de Ly49A e Ly49C e estes achados indicavam que muitas células NK estavam presentes no útero.

2.5 Neuroimunoendocrinologia

Há muito tempo, estudos na área da saúde buscam a compreensão dos mecanismos fisiológicos, implicados na regulação dos sistemas imune e nervoso. No entanto, estes estudos, anteriormente desenvolvidos de forma isolada e fragmentada, vêm cedendo espaço para pesquisas integradas, levando em consideração as complexas relações existentes entre os sistemas (COSTA-PINTO et al., 2006).

Segundo Reiche et al. (2004), a influência do sistema neuroendócrino exercida sobre o sistema imune foi primeiramente explicada por Seyle (1955), que ao expor animais a um conjunto bastante diversificado de estímulos nocivos, que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, pôde observar alterações como hipertrofia das glândulas adrenais, úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos. Segundo esse mesmo autor, Seyle encontrou tais alterações em todos os animais, independente do estímulo empregado, que o levou a concluir que representavam uma resposta orgânica à injúria, denominando-os de síndrome de adaptação geral, posteriormente chamada de estresse.

O eixo neuroendócrino relacionado ao ciclo reprodutivo feminino é vulnerável a mudanças e sensível a fatores psicossociais, ambientais e fisiológicos. Alterações como o transtorno disfórico pré-menstrual, a depressão pós-parto e os transtornos do humor relacionados à perimenopausa ou menopausa podem estar relacionadas a mudanças influenciadas por hormônios na função neurotransmissora (STEINER; DUNN; BORN, 2003).

Dmowski (1990) relatou uma “pseudomenopausa”, resultado da supressão ovariana causada por danazol. Efeitos como calores, depressão, alterações de humor também já foram relatados após uso de danazol (HUGHES; BROWN; TIFFIN, 2009).

Durante a gravidez há uma enorme produção de hormônios sexuais e não sexuais pela placenta, que trazem mudanças orgânicas e comportamentais também significativas. A gravidez é conhecida pelo forte componente de ambivalência e regressão psicológica. Estas manifestações psíquicas se manifestam em maior ou menor grau por sintomas orgânicos determinados pela nova situação hormonal. A presença de náuseas e vômitos nos três primeiros meses é considerada normal e causada por efeito do aumento exagerado na produção das gonadotrofinas coriônicas e estrógenos. Porém o grau de manifestação destes sintomas é fortemente influenciado pela situação emocional da gestante (BARINE, 1994).

Estudos com modelos de testes comportamentais que identificam ansiedade sugerem importante influência dos hormônios ovarianos (BROT; KOOB; BRITTON, 1995; LUCION et al., 1996). Além destes, diversos estudos sobre a influência dos hormônios gonadais sobre respostas cognitivas e mnemônicas em

fêmeas são relatados na literatura (BERMAN, 1997; GIBBS; GABOR, 2003; KEENAN, 2001; KOROL, 2004).

Desordens depressivas afetam com maior intensidade as mulheres após a menarca e isto ocorre devido à influência dos hormônios ovarianos e às mudanças de seus níveis durante o ciclo reprodutivo da mulher (KESSLER et al., 1993; WEISSMAN et al., 1993; ANGOLD; WORTHMAN, 1993; WILLIAMS et al., 1995). Alonso et al. (1991) não encontraram diferenças no tempo de imobilização em experimento de nado forçado entre ratos fêmeas durante as diferentes fases do ciclo estral. Entretanto Marvan, Chavez-Chavez e Santana (1996) relataram um aumento no tempo de imobilização neste experimento durante o diestro quando comparado ao estro.

Não existem na literatura dados sobre as alterações comportamentais durante a gestação em fêmeas de camundongos submetidas ao tratamento prévio com danazol.

Fêmeas de mamíferos produzem baixos níveis de andrógenos, quando comparadas aos machos da mesma espécie e, portanto, pouca atenção é dada ao estudo dos efeitos de andrógenos no eixo reprodutivo feminino. Estudo de revisão realizado por Foecking et al. (2008) procurou demonstrar os efeitos da exposição de ratas aos andrógenos em três estágios de desenvolvimento (fetal, pós-natal e adulto) Estes autores sugerem que andrógenos podem causar modificações epigenéticas em genes alvo de estrógeno no cérebro.

Andrógenos ligam-se ao receptor de andrógenos, um ligante citossólico ativador de fatores de transcrição que influenciam o desenvolvimento e também modificam a fisiologia e o comportamento na adolescência (HEBBARD et al., 2003; FRYE; SELIGA, 2001).

Em roedores, variações do nível dos andrógenos modulam a memória espacial e os animais precisam usar uma nova informação espacial que é aprendida em cada teste (SPRITZER et al., 2008). A castração também prejudica os testes com o labirinto em T (KRITZER et al., 2001). Utilizando 17 β -estradiol os resultados foram opostos, sugerindo que o efeito é androgênico e não estrogênico (KRITZER et al., 2001; GIBBS, 2005). Castração também aumenta os erros nos testes de memória (SPRITZER et al., 2008). Andrógenos podem também modular outros padrões de comportamento tais como a ansiedade e memória de fuga em ratos (FRYE; LACEY, 2001).

Os efeitos dos andrógenos parecem estar limitados a certos domínios cognitivos, especialmente à memória espacial, mas esta hipótese ainda permanece indefinida. Benice e Raber (2009) testaram camundongos castrados comparados a um grupo controle (cirurgia, sem castração) através de vários testes comportamentais tentando responder como os andrógenos afetam múltiplos ou específicos domínios cognitivos em camundongos machos. Estes autores observaram que a castração prejudica os testes com memória espacial. Em contraste, a castração não teve efeito nos testes de memória para reconhecimento de objetos, coordenação motora ou memória passiva de fuga. A castração aumentou a ansiedade, o que foi observado no teste de abertura de campo. Os autores concluem que os andrógenos afetam especificamente a memória espacial e os processos neurobiológicos em torno da formação desta memória devem ser diferentemente afetados pelos andrógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de danazol no comportamento de camundongos prenhes, bem como as possíveis alterações na implantação, viabilidade e perda embrionária, morfologia do útero e incidência dos subtipos de células uNK reativos para lectina DBA.

3.2 Específicos

- Analisar as alterações comportamentais dos camundongos prenhes tratados previamente com três diferentes concentrações de danazol com o intuito de identificar atividade ansiolítica (labirinto em cruz elevado), atividade antidepressiva (nado forçado) e teste de memória (teste do reconhecimento espontâneo de objetos).
- Analisar os efeitos de danazol nas taxas de implantação, viabilidade e perda embrionária de camundongos.
- Analisar a morfologia do útero.
- Analisar as características das células uNK de camundongos tratados com danazol e controle.
- Analisar a expressão de N-Acetil-Galactosamina nas células uNK em camundongos tratados com danazol e a possível alteração no padrão de reatividade da lectina DBA nestas células.
- Analisar a distribuição dos 4 subtipos de células uNK e quantificá-los em três áreas do útero prenhe de camundongos tratados com danazol e controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas noventa e três fêmeas de camundongos da linhagem Swiss, obtidas do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, tratadas durante 14 dias por meio de gavagem. O tratamento utilizado em cada grupo experimental pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1
Grupos experimentais, número de animais e tratamentos realizados

	n	Tratamento (Gavagem)
Grupo Controle	22	água destilada + tween 1%
Grupo danazol 0,75	22	água destilada + tween 1% + danazol 0,75 mg/kg
Grupo danazol 7,5	24	água destilada + tween 1% + danazol 7,5 mg/kg
Grupo danazol 75	25	água destilada + tween 1% + danazol 75 mg/kg

Nota: n. número de animais utilizados

Fonte: do autor

A dosagem de 7,5 mg/kg de danazol equivale a dosagem terapêutica média utilizada em humanos (400-500 mg/dia) e foram também utilizadas concentrações 10 vezes menor e 10 vezes maior, de acordo com metodologia utilizada por Kusakabe et al. (2007). O tratamento nos animais foi suspenso por 4 dias e após este prazo as fêmeas foram acasaladas com os machos. Para o acasalamento foram colocadas 3 fêmeas para cada macho da mesma linhagem, e estes permaneceram juntos durante a noite, sendo inspecionados pela manhã. O dia em que foi constatada a presença do tampão vaginal, através de inspeção visual, foi considerado o 1º dia de gestação. Cada animal foi colocado para acasalar por até, no máximo, 16 dias. Após este período, os animais que não apresentaram sucesso da cópula (presença do tampão vaginal), foram descartados.

Os animais foram também agrupados de acordo com o dia de gestação (ddg) no qual foram realizados os testes comportamentais e análises morfológicas com coleta dos sítios de implantação para processamento histológico (Tabela 2).

Tabela 2
Grupos experimentais, número de animais e dias de gestação.

Grupo	Número de animais					
	Total	6ºddg	8ºddg	10ºddg	12ºddg	15ºddg
Controle	22	5	4	5	4	4
Danazol 0,75	22	4	4	5	4	5
Danazol 7,5	24	4	5	5	5	5
Danazol 75	25	5	5	5	5	5

Nota: ddg: dia de gestação

Fonte: do autor

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UNIFAL-MG (em anexo).

Os animais durante o período de tratamento e acasalamento foram mantidos em ciclo de 12/12 horas claro e escuro, em regime de alimentação e acesso à água *ad libitum*.

4.2 Análises Comportamentais

Os animais tratados com danazol e o grupo controle foram submetidos aos testes comportamentais no 6º, 8º, 10º, 12º e 15º ddg. Estes testes tiveram o intuito de identificar a atividade ansiolítica (labirinto em cruz elevado), teste de memória (teste do reconhecimento espontâneo de objetos) e atividade antidepressiva (nado forçado).

Os testes foram realizados no período da manhã, entre 8 e 11 horas, e tiveram duração padronizada. A sala para realização dos testes foi adequada com temperatura controlada (25 - 27º) e luminosidade natural.

Cada animal foi submetido a apenas uma sessão de cada teste e foram realizados, respectivamente, no mesmo dia, o teste do labirinto em cruz, seguido do teste de reconhecimento de objetos e finalmente o teste de nado forçado.

Para registro dos testes foram feitas filmagens utilizando web cam Logitech modelo C 200. A análise dos vídeos foi realizada através do software VLC

media player (versão 4.4.2). Os parâmetros (tempos) foram cronometrados e registrados em tabela específica para cada teste (apêndices A, B e C).

4.2.1 Análise de ansiedade pelo teste de labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado foi usado como modelo de avaliação de ansiedade nesse estudo. O teste do labirinto em cruz elevado foi executado em um aparato (Figura 2A) com dois braços abertos (30 x 5 cm cada), dois braços fechados (30 x 5 x 15,25 cm cada) e uma plataforma central (5 x 5 cm formando uma cruz suspensa a 40 cm de altura. Os animais foram colocados no centro de frente para um dos braços fechados e filmados por cinco minutos. As medidas comportamentais registradas foram: frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos (entradas e tempo) revela um efeito ansiolítico (LISTER, 1987; FILE et al., 1990, FILE, 2001; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

4.2.2 Análise de memória de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi adaptado do modelo descrito anteriormente por Abe, Ishida e Iwasaki (2004). Este teste foi dividido em 3 sessões: familiarização, exploração global e teste.

A sessão de familiarização foi realizada duas horas antes da etapa de exploração global. Durante esta sessão foi permitido a cada camundongo o contato com o ambiente sem a presença dos objetos, com o intuito de promover a familiarização do animal com local no qual seriam realizados os testes. O ambiente (Figura 2B, 2C) consiste em uma caixa de madeira (65 x 45 x 45cm) forrada com maravalha (3 cm de altura). A sessão de exploração global (treino) consistiu na filmagem, por 5 minutos, de cada animal exposto a dois objetos idênticos (A1 e A2) no ambiente descrito anteriormente. O camundongo foi deixado no canto oposto ao

local onde os objetos estavam colocados. Foi mensurado o tempo gasto na exploração dos objetos A1 e A2 pelo camundongo através da análise do vídeo.

Na fase de teste, realizada 30 minutos após o treino, os objetos foram substituídos por um terceiro (A3) objeto idêntico aos 2 anteriores e por um quarto objeto (B) com formato diferente, porém com tamanho semelhante. Os objetos da fase de teste foram colocados no mesmo lugar dos objetos da fase de exploração global e o camundongo foi exposto aos objetos e filmado por 5 minutos. Foi mensurado o tempo gasto na exploração de cada objeto. A exploração do objeto foi definida como direcionamento do focinho ao objeto (a uma distância de pelo menos 2 cm) e toque do focinho no objeto.

A exploração global (EG) dos objetos foi a soma dos tempos de exploração do primeiro e segundo objeto:

$$EG = A1+A2$$

O teste (T) foi definido como sendo a soma dos tempos de exploração do terceiro e quarto objeto:

$$T = B+A3$$

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

$$I_R = B-A3 / B+A3$$

4.2.3 Análise de depressão pelo teste do nado forçado

Para identificar os efeitos de danazol relacionados à depressão foi utilizado o teste do nado forçado. Este teste foi desenvolvido por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) para pesquisas com drogas antidepressivas. Foi utilizado um cilindro vertical de vidro, com dimensões de 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, preenchido com água a 30°C até a altura de 20 cm (Figura 2D). O volume de água deve permitir que o animal possa nadar ou boiar sem encostar as patas ou a cauda

no fundo do recipiente. Para o teste, cada camundongo foi colocado no cilindro e filmado por 6 minutos. Durante a análise da filmagem foi cronometrado o tempo no qual o animal apresentava o comportamento de boiar. Somente os 4 últimos minutos foram analisados, de acordo com a metodologia de Porsolt, Bertin e Jalfre (1977).

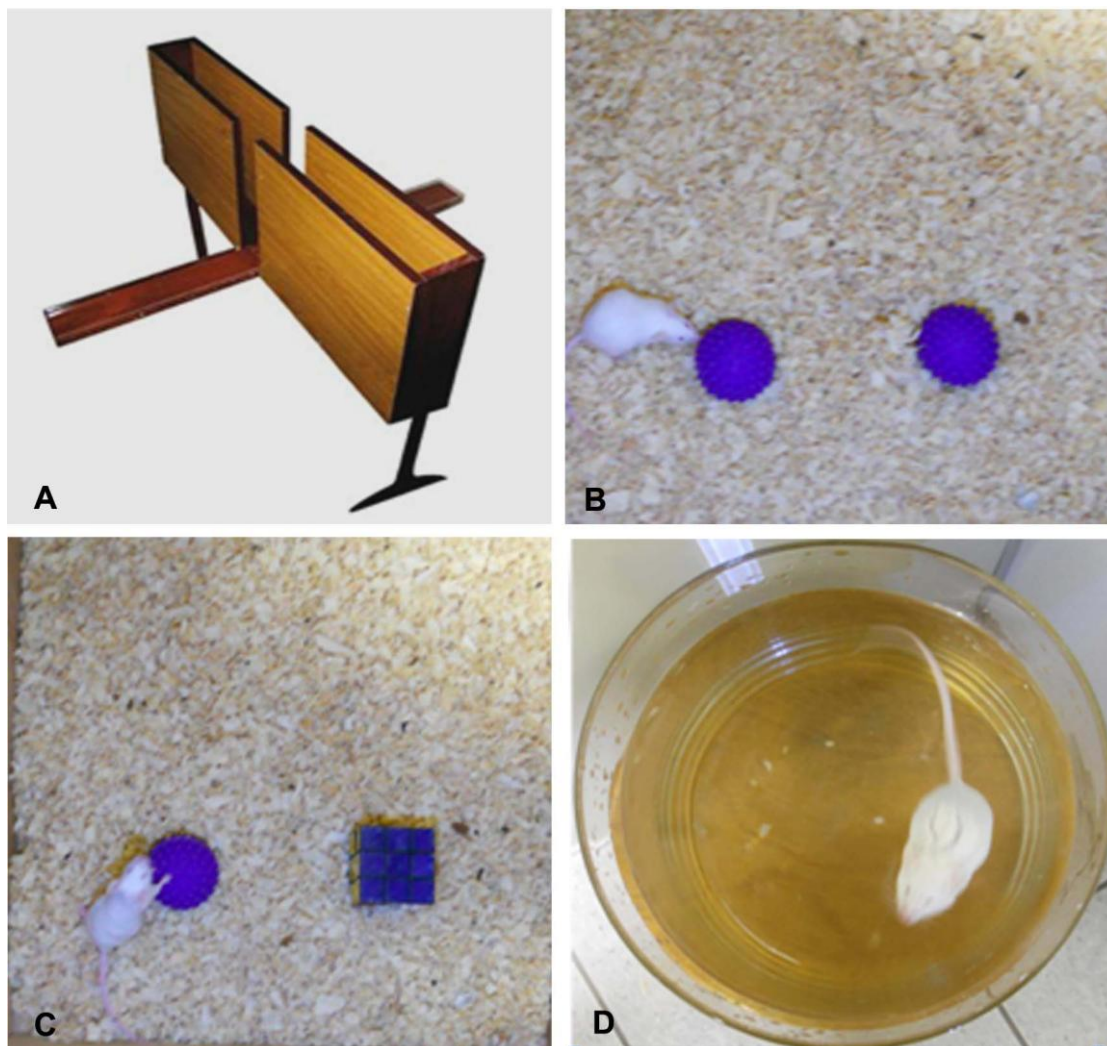


Figura 2 – Aparatos utilizados para os testes comportamentais: A - Labirinto em Cruz Elevado, B e C – Teste de Memória; D – Nado Forçado.

Fonte: A – Instituto de Neurociências e Comportamento – USP (www.inec-usp.org); B, C, D - Do autor.

4.3 Análise da Fertilidade

Com o objetivo de analisar os efeitos de danazol na fertilidade dos animais, foram investigados o tempo para o sucesso da cópula, a taxa de prenhez, o

número de sítios de implantação embrionária: totais, viáveis, em reabsorção (perda embrionária) e número de corpos lúteos.

O tempo para sucesso da cópula foi mensurado a partir do primeiro dia de acasalamento do animal até o dia em que o tampão vaginal foi observado através da inspeção visual.

A taxa de prenhez (TP) foi calculada avaliando o número de prenhezes confirmadas (PC) após perfusão dos animais sobre o número de tampões vaginais (TV) detectados com a inspeção visual, conforme a fórmula:

$$TP = \frac{PC \times 100}{TV}$$

4.3.1 Quantificação dos corpos lúteos, sítios de implantação embrionária e análises das taxas de implantação, viabilidade e perda embrionária

Após a realização dos testes comportamentais, todos os animais no 6^o, 8^o, 10^o, 12^o e 15^o ddg foram anestesiados com solução contendo 0,07 mL para cada 10g-animal de Cloridrato de ketamina e Cloridrato de tiasina e perfundidos com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Foi feita remoção dos cornos uterinos para análise morfológica, citoquímica e estereológica, de acordo com metodologia descrita por Paffaro et al. (2003).

A quantificação dos corpos lúteos foi feita em microscópio estereoscópico. Os sítios de implantação embrionária total (ST), viáveis (SV) e em reabsorção (SR) encontrados nos cornos uterinos foram quantificados macroscopicamente. Os sítios de implantação embrionária classificados como viáveis foram aqueles que apresentaram características gerais e tamanho dentro dos padrões de normalidade. Foram classificados como sítios de implantação embrionária em reabsorção aqueles que apresentaram cor mais escura e diminuição significativa de seu tamanho quando comparado aos demais sítios do mesmo animal.

Os números encontrados de corpos lúteos (NL) e sítios de implantação foram utilizados para o cálculo da taxa de implantação (I), taxa de viabilidade (V) e taxa de perda embrionária (P).

O ST é igual a soma dos sítios de implantação viáveis (SV) com os sítios em aparente reabsorção (SR) e a taxa de implantação foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = \frac{(SV + SR) \times 100}{NL}$$

Para o cálculo da porcentagem de embriões viáveis (V) utilizou-se:

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

A porcentagem de perda embrionária (P) foi calculada de acordo com fórmula:

$$P = \frac{SR \times 100}{NL}$$

4.4 Análise morfológica e citoquímica

4.4.1 Processamento para embebição em parafina

Os sítios de implantação embrionária coletados foram desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol para embebição em parafina. Foram obtidos cortes histológicos dos blocos de parafina com espessura de 7µm e estes cortes foram montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina a 10%. Os cortes histológicos dos sítios de implantação foram submetidos à citoquímica de lectina DBA (*Dolichos Biflorus Agglutinin*).

4.4.2 Citoquímica com lectina DBA (*Dolichos Biflorus Agglutinin*)

Os cortes histológicos contendo os sítios de implantação embrionária dos camundongos foram desparafinizados com xilol por 20 minutos duas vezes,

seguindo-se a hidratação por cinco minutos em gradiente decrescente de etanol absoluto, 95°C, 85°C, 80°C e 70°C e em água destilada. Após a hidratação os cortes foram submetidos à reação de citoquímica para lectina DBA da seguinte maneira:

- Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- Incubação com H₂O₂ (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- Incubação lectina DBA (*Doblicos Biflorus Agglutinin*) biotinada (Sigma Chemical Co. – USA) diluída na proporção de 1:300 em PBS/BSA 1% pH 6,8, “overnight”, a 4° C; (os controles negativos foram obtidos retirando dos cortes a lectina DBA nesta etapa);
- Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação com o complexo Avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:50 por 1 hora;
- Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Lavagem com TBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma) 0,5 mL + TBS 0,05M pH 7,4 (4,5 mL) + H₂O₂ 30 vols. (10 µL)
- Lavagem com água destilada;
- Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;

Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (EcoMount – Biocare Medical) para observação ao microscópio fotônico (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

4.5 Análise estereológica em microscopia fotônica

As análises estereológicas foram realizadas em cortes histológicos de sítios de implantação embrionária submetidos à reação de citoquímica de lectina DBA.

4.5.1 Amostragem

A amostragem para análise estereológica foi constituída de 3 cortes obtidos de 3 sítios de implantação distintos, procedentes de três animais de cada grupo (controle, danazol 0,75 mg/kg, 7,5 mg/kg, 75 mg/kg) no 6^o, 8^o, 10^o, 12^o e 15^o ddg, totalizando 60 animais.

A distribuição dos animais utilizados para a análise estereológica e seus grupos experimentais estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3

Grupos experimentais, número de animais e dias de gestação utilizados para análise estereológica

Grupo	Número de animais					
	Total	6 ^o ddg	8 ^o ddg	10 ^o ddg	12 ^o ddg	15 ^o ddg
Controle	15	3	3	3	3	3
Danazol 0,75	15	3	3	3	3	3
Danazol 7,5	15	3	3	3	3	3
Danazol 75	15	3	3	3	3	3

Nota: ddg: dia de gestação

Fonte: do autor

4.5.2 Análise Estereológica

Nesta análise quantitativa, foi obtida a densidade dos perfis em uma área teste ($AT=30 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) para o total de células *uNK* e para cada um dos quatro subtipos distintos de *uNK* localizados em 3 áreas (Figura 3) do sítio de implantação embrionária onde se distribuem estas células: Área 1: próxima ao miométrio na região mesometrial; Área 2: no endométrio entre o miométrio e o embrião implantado e; Área 3: no endométrio próximo ao embrião (PAFFARO JR et al., 2003). A área teste foi delimitada por meio de um sistema de teste quadrático que possuía duas linhas de exclusão, sendo contadas apenas as células encontradas na área teste que exibiram o núcleo nos cortes observados, exceto aquelas que tocaram as duas linhas de exclusão do sistema teste.

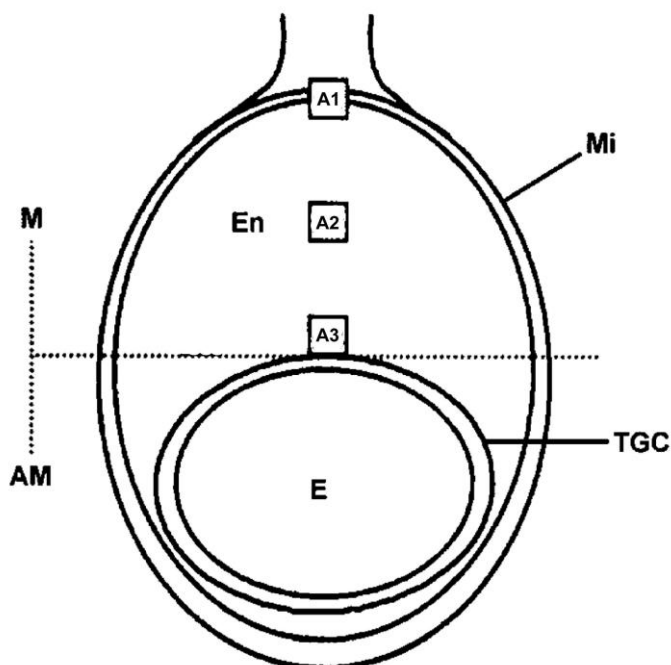


Figura 3 - Diagrama representando um sítio de implantação de camundongo no 10^o ddg e áreas 1 (A1), 2 (A2) e 3 (A3) utilizadas para quantificação dos subtipos de células *uNK*. M - Região mesometrial; AM - região antimesometrial; Mi - Míométrio; En - Endométrio; TGC - células trofoblásticas gigantes; E - Embrião.

Fonte: Modificado de Paffaro JR et al. (2003).

Para a análise estereológica, os cortes submetidos à citoquímica com lectina DBA de cada sítio de implantação embrionária foram fotografados em microscópio fotônico (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital

Sigth-Fi1/Nikon/Japan). A contagem dos subtipos celulares foi feita em software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

4.6 Análise Estatística

O experimento foi conduzido por delineamento inteiramente casualizado (DIC). A análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA) seguida do teste de comparação das médias de Tukey. Quando os pré-supostos de normalidade e de homocedasticidade não foram satisfeitos, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Os procedimentos foram conduzidos com auxílio do programa estatístico de domínio público BioEstat 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso trabalho foram realizados, primeiramente, testes para análise de possíveis mudanças comportamentais em camundongos prenhes tratados previamente com danazol (água destilada + tween 1% + danazol em diferentes concentrações) e controle (água destilada + tween 1%).

A ansiedade foi assim investigada utilizando como aparato o labirinto em cruz elevado, onde os parâmetros avaliados foram taxa de entrada e taxa de permanência nos braços abertos e fechados. Este modelo experimental para avaliação da ansiedade foi validado em camundongos por Lister (1987), mostrando-se útil como teste para investigar agentes ansiolíticos e ansigêncios. Também foi validado para outras espécies: cobaias (REX; FINK; MARSDEN, 1994), ratos selvagens (HENDRIE; EILAM; WEISS, 1994) e hamsters (YANNIELLI; KANTEREWICZ; CARDINALLI, 1996), sendo bem aceito na literatura.

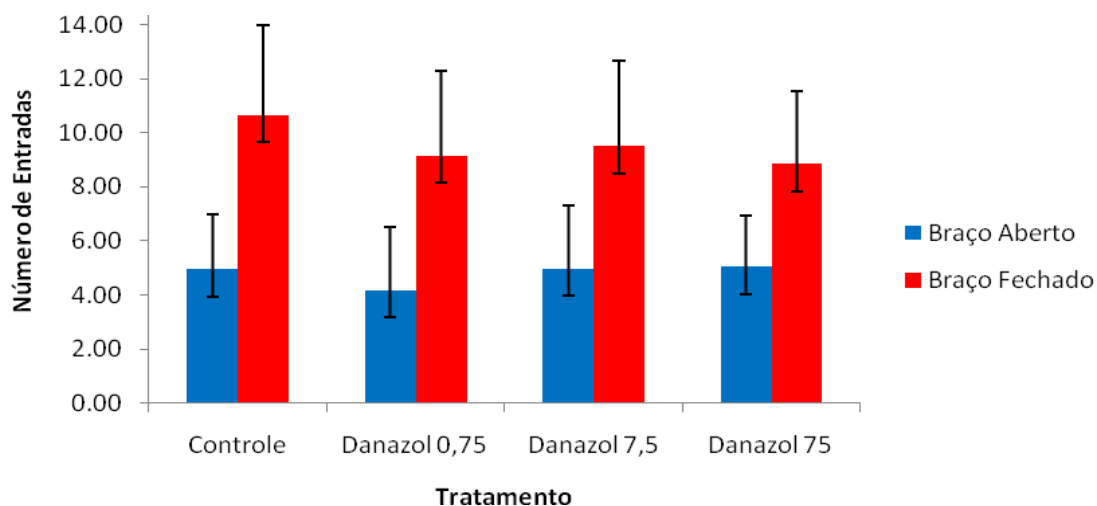


Gráfico 1 – Frequência de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.
Fonte: Do autor.

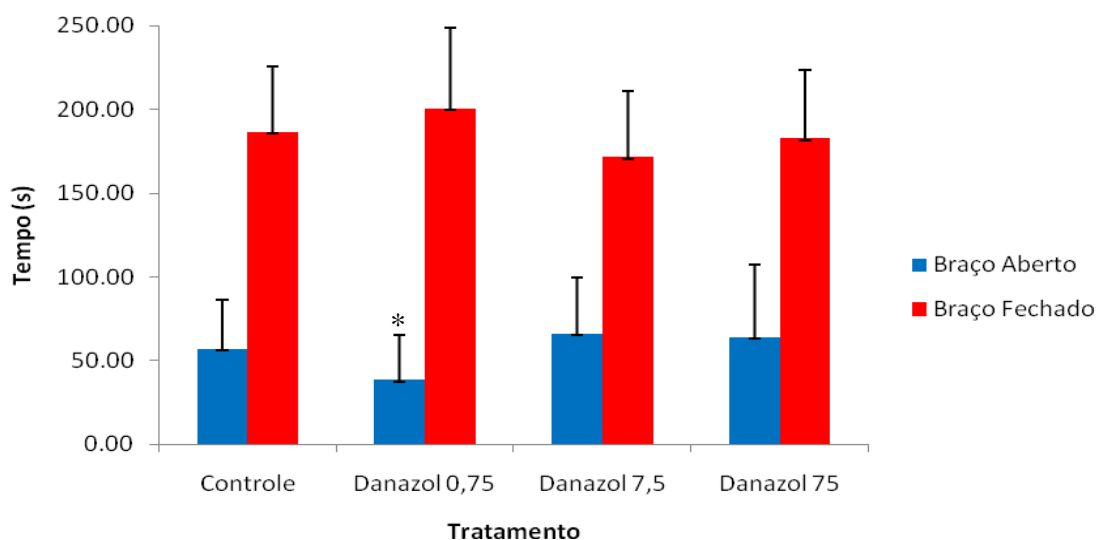


Gráfico 2 – Tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado.
 (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do autor.

Os Gráficos 1 e 2 apresentam os resultados obtidos com a análise geral da frequência de entrada e o tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos e fechados nos grupos tratados com diferentes concentrações de danazol e controle, independente do dia de gestação do camundongo.

A análise da frequência de entrada nos braços abertos e fechados do labirinto não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Gráfico 1). No entanto, após análise do tempo de permanência nos braços abertos e fechados (Gráfico 2) foi possível constatar que a taxa de permanência nos braços abertos foi menor em animais tratados com danazol na concentração de 0,75mg/Kg ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo controle e quando comparado aos animais tratados com as demais concentrações de danazol.

Segundo Lister (1987); File et al. (1990) e Carobrez e Bertoglio (2005) uma diminuição no tempo de permanência no braço aberto é indicativo de aumento da ansiedade nestes animais, o que sugere o efeito ansiogênico de danazol em concentração de 0,75 mg/Kg. As dosagens de 7,5 e 75 mg/Kg de danazol não alteraram o comportamento destes animais de maneira detectável por este teste. De fato, danazol em baixas concentrações é conhecido por se ligar a receptores de progesterona bloqueando seus efeitos (MORGANTE et al., 1999). É possível, portanto, que em camundongos tratados previamente com a dosagem baixa de 0,75mg/Kg de danazol este se ligue a receptores de progesterona, bloqueando-os.

Frye e Walf (2004) e Walf, Rhodes e Frye (2006) constataram aumento da ansiedade em ratas ovariectomizadas devido à diminuição de estrógeno e progesterona. Em concentrações mais altas, apesar de sua menor afinidade pelos receptores de estrógeno, danazol liga-se a estes nas células-alvo, apesar da presença de esteróides endógenos (TAMAYA et al., 1984).

Na análise do tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico 3) e nos braços fechados (Gráfico 4) nos animais prenhes em todos os dias de gestação, foi observado que danazol alterava com mais intensidade e nas três concentrações os tempos de permanência dos animais nos braços abertos. Interessantemente, no 15º ddg foi notado que para as três concentrações os tempos de permanência nos braços abertos e fechados se aproximavam dos valores obtidos com os animais do grupo controle. De fato, danazol leva apenas 24 horas para ser eliminado do organismo; no entanto, o ciclo menstrual em mulheres volta a se regularizar apenas 2 ou 3 meses após a interrupção do uso deste hormônio (PHARMACY HEALTH, 2003). Portanto, nossos resultados sugerem que por volta do 15º ddg os efeitos de danazol no comportamento de ansiedade dos animais já foram revertidos, fazendo com que os tempos de permanência nos braços abertos e fechados se aproximem dos tempos normais de animais controle.

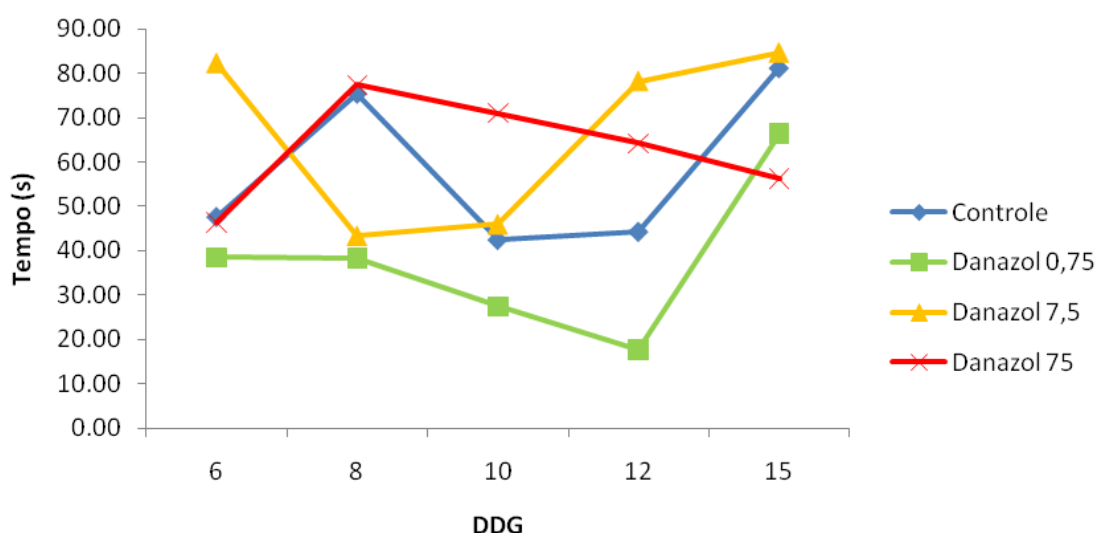


Gráfico 3 - Tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.

Fonte: Do autor.

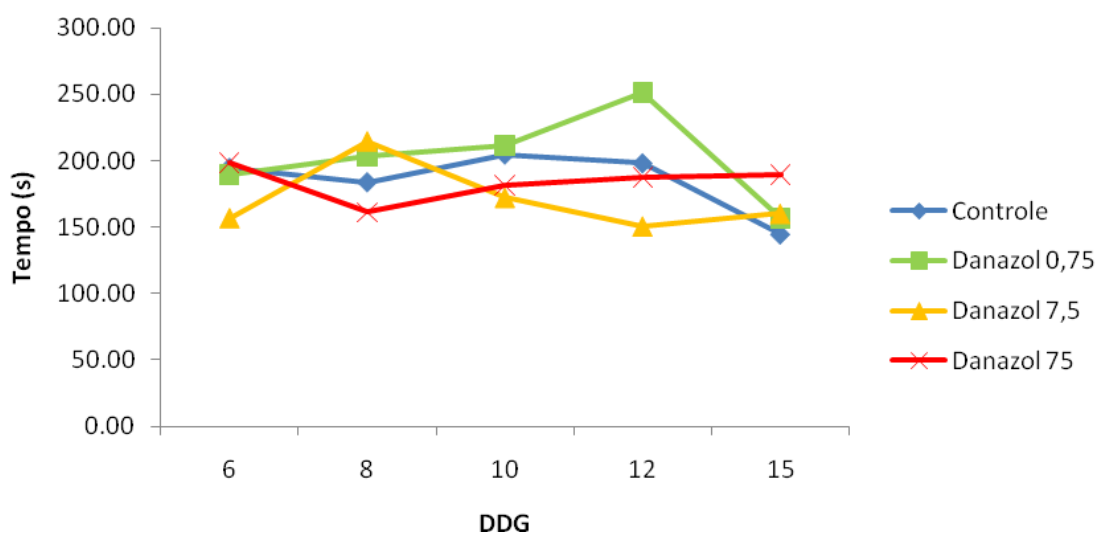


Gráfico 4 - Tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado por dia de gestação.

Fonte: Do autor.

Após aplicação dos testes de reconhecimento espontâneo de objetos para verificação do possível efeito de danazol na perda de memória de curto prazo, foi notado que até o 8º ddg nenhum grupo de camundongos apresentou sinais de diminuição ou aumento da capacidade de memória de curto prazo. No entanto, no 10º ddg, surpreendentemente, embora os animais controle mantivessem inalterada a habilidade de reconhecer objetos, os animais tratados com a dosagem mais baixa de danazol apresentaram índice de reconhecimento significativamente menor, ou seja, diminuição na capacidade de memória em relação ao controle. No entanto, no mesmo dia de gestação (10º ddg) na dosagem de 7,5 mg/Kg a capacidade de memória de curto prazo estava aumentada significativamente em relação aos animais controle e tratados com 0,75 mg/Kg, enquanto os animais tratados com a maior dosagem obtiveram valores da taxa de reconhecimento semelhantes ao controle (Gráfico 5). No 15º ddg, no entanto, os animais tratados com a menor concentração de danazol (0,75 mg/Kg) passaram a demonstrar melhora na capacidade da retenção de memória e aqueles tratados com 7,5 mg/Kg demonstraram diminuição na taxa de reconhecimento tornando-se ambos os grupos semelhantes ao controle neste dia de gestação.

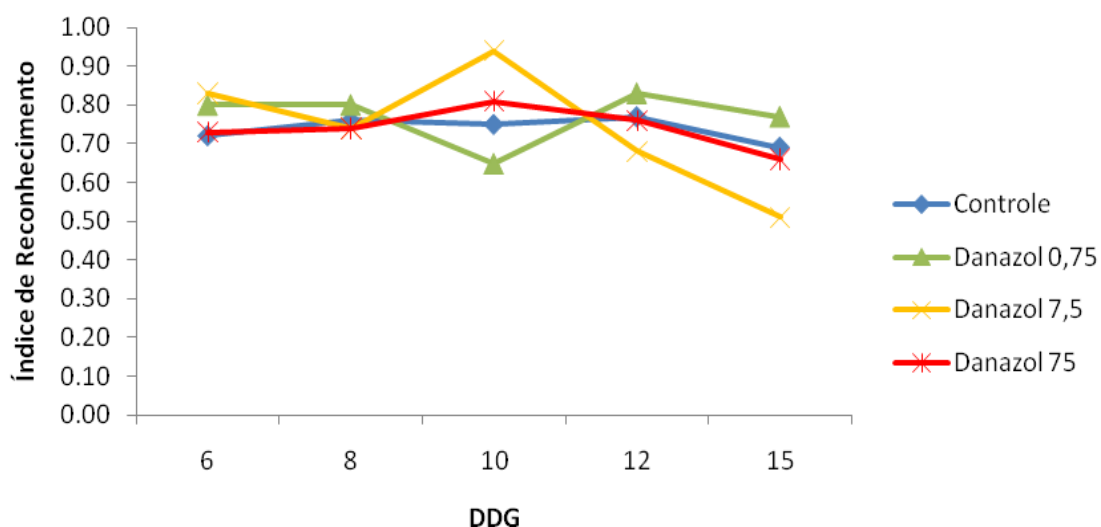


Gráfico 5 – Índice de Reconhecimento em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.

Fonte: Do autor.

Em humanos, danazol é utilizado em tratamentos para endometriose em dosagens que variam de 200 mg (casos mais brandos) a 800 mg (casos severos) durante 3 a 6 meses (DANAZOL, 2010). Nossos resultados indicam que o tratamento de camundongos com danazol em dosagem equivalente à terapêutica em humanos (7,5 mg/Kg) induziu melhora na memória de curto prazo no 10º ddg, seguida por diminuição da mesma no 15º ddg. Entretanto, o contrário foi observado com dosagem menor (0,75 mg/Kg), a qual provocou perda de memória de curto prazo no 10º ddg e retorno para os níveis normais no 15º ddg.

Spencer et al. (2008) em camundongos e Shang et al. (2010) em ratos, demonstraram o efeito na melhora da memória após tratamento com estrógeno. O fato de que danazol liga-se preferencialmente em receptores de progesterona quando em dosagens baixas e em receptores de estrógeno, andrógenos e progesterona em dosagens mais altas (MORGANTE et al., 1999; YAMASHITA et al., 1994; TAMAYA et al., 1984) sugere que em camundongos tratados com a dose de 7,5 mg/Kg, danazol exerceu efeito estrogênico o que pode ter causado um incremento na memória de curto prazo nestes animais de maneira antagônica ao observado para animais tratados com baixas taxas de danazol. Novamente, a diminuição dos efeitos de danazol após pelo menos 19 dias do término do tratamento com danazol (15º ddg) pode explicar o retorno das taxas de

reconhecimento de objetos para números semelhantes àqueles observados em animais controle no 15º ddg.

Ressalta-se que embora muitos trabalhos relatem associação entre perda de memória e gravidez em humanos, Christensen; Leach e Mackinnon (2010) observaram que estas conclusões estavam em desacordo com estudos em animais, que muitas vezes mostram que aprendizado e memória chegam a melhorar quando as fêmeas estão prenhes. Em nosso estudo no 6º e 8º e 12º ddg, não houve diferença significativa quanto à taxa de reconhecimento em todos os grupos tratados com danazol e controle, o que mostra que a memória de curto prazo, nestes dias de gestação manteve-se inalterada com o tratamento com danazol. Valores significativos observados no 10º ddg podem corroborar a associação entre funções cognitivas e sistema imunológico durante a gravidez, já que neste período podem ser observadas maiores alterações no ambiente uterino, tais como o pico de proliferação de células natural killer uterinas e o aumento na produção de citocinas.

Acompanhando o ocorrido com o índice de reconhecimento em animais tratados com danazol, no 10º ddg o tempo de exploração global (A1+A2) na sessão de treino, era significativamente menor em animais submetidos às três dosagens de danazol, com valores de exploração menores à medida que a dosagem aumentava (Gráfico 6). Segundo Giusti-Paiva et al. (2003) e Parrillo, Parker e Natanson (1990), em seus estudos da sepse provocada por LPS em ratos, a queda no tempo de exploração global indica um comportamento de sonolência e apatia, característico do comportamento doentio. É provável que o comportamento semelhante a este seja provocado por danazol no 10º ddg e esta ação parece ser dose-dependente.

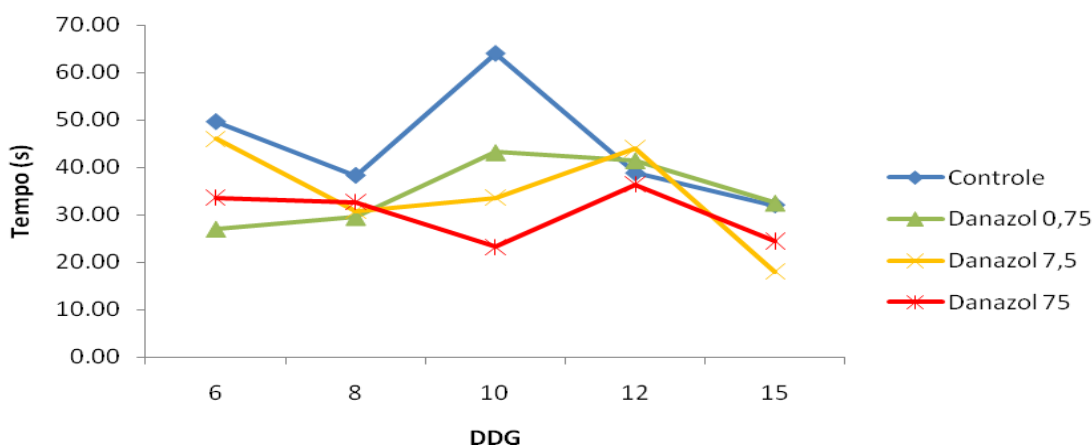


Gráfico 6 – Tempo de Exploração Global em teste de memória nos grupos experimentais, nos diferentes dias de gestação.

Fonte: Do autor.

Os animais de cada grupo experimental foram submetidos ao teste de nado forçado para avaliar a ocorrência de comportamento depressivo. Este teste, desenvolvido por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) para pesquisas com drogas antidepressivas avalia o tempo em que o animal permanece boiando durante o experimento, o que é caracterizado como comportamento depressivo.

Foi observado que os animais tratados com danazol 7,5 mg/kg permaneciam boiando por maior período que os animais do grupo controle e dos outros grupos de animais tratados com Danazol (Gráfico 7).

Quando analisado o efeito de danazol no comportamento de animais pelo teste do nado forçado e no decorrer da gestação (Gráfico 8), foi possível notar que o grupo tratado com danazol 7,5 mg/kg permaneceu o mesmo tempo boiando (estático) que os animais dos outros grupos no 6º ddg. Entretanto, esse tempo foi maior do 8º ddg até 15º ddg em relação aos animais tratados com dosagem mais baixa e mais alta de danazol. Interessantemente, no 10º ddg o tempo de permanência estático dos animais tratados com 7,5 mg/kg era idêntico ao do controle. De fato o comportamento depressivo é esperado quando animais são tratados com hormônios androgênicos, no entanto, surpreendentemente a dosagem que provocou comportamento equivalente à depressão de camundongos em nosso estudo foi aquela compatível com a dosagem terapêutica utilizada em humanos, o que corrobora e explica os achados descritos na literatura que relatam depressão em mulheres submetidas ao tratamento com danazol (FOECKING et al., 2008; KUSAKABE et al., 2007; DMOWSKI, 1990).

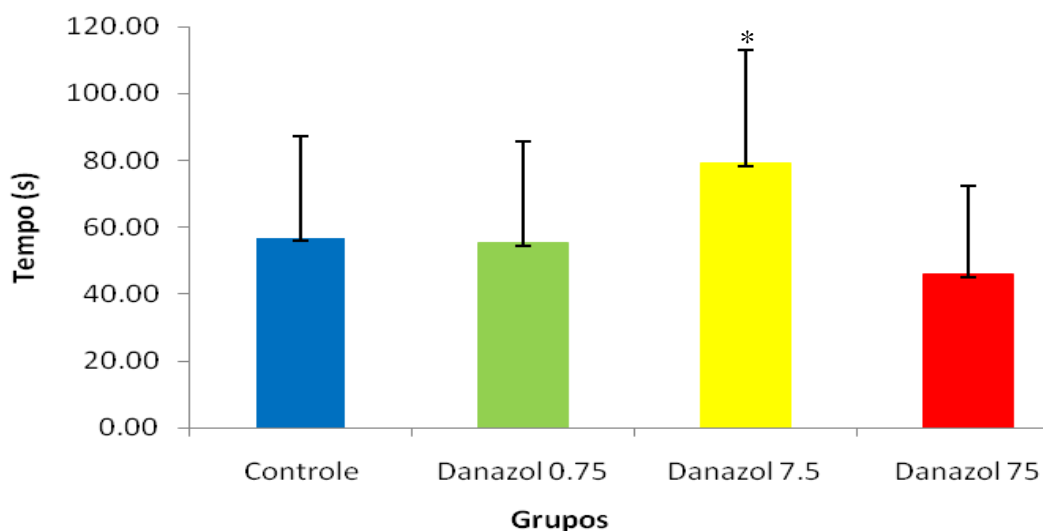


Gráfico 7 – Médias de tempo em que os animais permaneceram estáticos em experimento de nado forçado nos grupos experimentais.

(*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do autor.

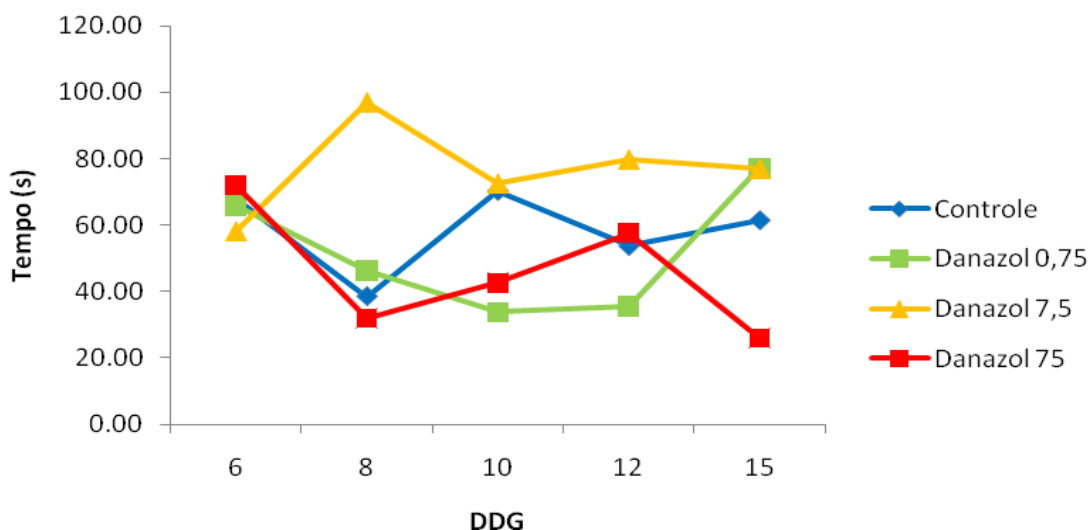


Gráfico 8 – Médias de tempo em que os animais permaneceram estáticos em experimento de nado forçado, nos diferentes grupos experimentais e dias de gestação.

Fonte: Do autor.

Com o objetivo de analisar os efeitos de danazol na fertilidade dos animais, foram investigados o tempo para o sucesso da cópula, taxa de prenhez, número total de sítios de implantação, os sítios viáveis e os em reabsorção e o número de corpos lúteos (Tabela 4). Após este estudo foi possível constatar que os tratamentos com danazol nas três dosagens utilizadas em nosso estudo causaram

atraso significativo no período para sucesso da cópula. Estes resultados estão de acordo com aqueles que revelaram que danazol atrasa o ciclo estral de camundongos por agir sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas por meio da inibição do hormônio liberador de gonadotrofinas (FRANCHIMONT; CRAMILION, 1977); e também concordam com os resultados de Kusakabe et al., 2007, que revelaram atraso no tempo para sucesso da prenhez após tratamento com este hormônio. Interessantemente, mesmo atrasando o tempo para sucesso da cópula, danazol foi capaz de aumentar a taxa de prenhez de camundongos até com dosagens baixas, o que demonstra a eficiência do tratamento prévio com esta droga na melhora das condições uterinas.

Quando analisado o número médio de sítios de implantação embrionária, foi observado um número significativamente menor destes sítios em animais tratados com a menor dosagem (0,75 mg/Kg), e maior, em animais tratados com a dosagem equivalente à terapêutica (7,5 mg/Kg). Quanto aos sítios de implantação embrionária diagnosticados como viáveis, o número destes sítios também foi menor com a dosagem 0,75 mg/Kg e maior com a dosagem terapêutica. No entanto, não foram observadas diferenças significantes entre os números de sítios de implantação diagnosticados macroscopicamente como sítios em reabsorção e entre os números de corpos lúteos. Estes resultados demonstraram que danazol é capaz de aumentar a taxa de prenhez e o número de sítios de implantação na dosagem conhecida como terapêutica, sem, contudo, em nenhuma das dosagens, interferir na função ovariana e causar aumento na reabsorção embrionária em camundongos. De fato, a ação dose dependente de danazol já foi descrita na literatura por Olsson, Hillensjo e Nilsson (1986) e Morgante et al. (1999) e em camundongos a dosagem de 7,5mg/Kg foi apontada por Kusakabe et al. (2007) como aquela ideal para mudar as condições do útero sem causar alterações deletérias durante a gestação.

Tabela 4
Estudo da fertilidade

Dados	Controle	Danazol		
		0,75 mg/kg	7,5 mg/kg	75 mg/kg
PSC (dias)	3.8 ± 1.33	5.62 ± 2.69 *	5.05 ± 2.28 *	6.86 ± 3.81 *
TP (%)	76.6 (30)	91.6 (24)	86.2 (29)	86.2 (29)
SI	10,4 ± 2,6	8,5 ± 4,0 *	11,3 ± 2,8 *	10,1 ± 3,5
SV	9,6 ± 2,6	7,9 ± 3,7 *	10,6 ± 3,0 *	9,5 ± 3,4
SR	0,8 ± 1,5	0,5 ± 1,3	0,7 ± 1,5	0,6 ± 1,1
NL	12,5 ± 2,5	11,9 ± 2,7	13,6 ± 3,3	12,5 ± 2,3

Nota: PSC. Período para sucesso da cópula, TP. Taxa de prenhez. SI. Número de sítios de implantação. SV. Número de sítios de implantação viáveis. SR. Número de sítios em reabsorção, NL. Número de corpos lúteos. Controle (água + tween).

(*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do autor.

Quando observados macroscopicamente, os cornos uterinos dos animais tratados com danazol não apresentaram sinais de hemorragia no interior dos sítios de implantação em nenhum dos grupos analisados em nosso estudo e os sítios em reabsorção eram raros (Figura 4). Foram constatados sinais equivalentes à hemorragia apenas entre os sítios de implantação de animais tratados com danazol, mas estes foram também observados em cornos uterinos de animais controle. Foi possível observar macroscopicamente, em todos os dias de gestação analisados, uma diminuição no número de sítios de implantação em cornos uterinos de camundongos tratados com a dosagem de 0,75 mg/Kg (Figura 4 b, f, j) e um maior número destes sítios em animais tratados com 7,5 mg/Kg (Figura 4 c, g, k) em relação aos animais do grupo controle (Figuras 4 a, e, i). A dosagem de 75 mg/kg não provocou alterações nos sítios de implantação diagnosticáveis macroscopicamente (Figura 4 d, h, l).

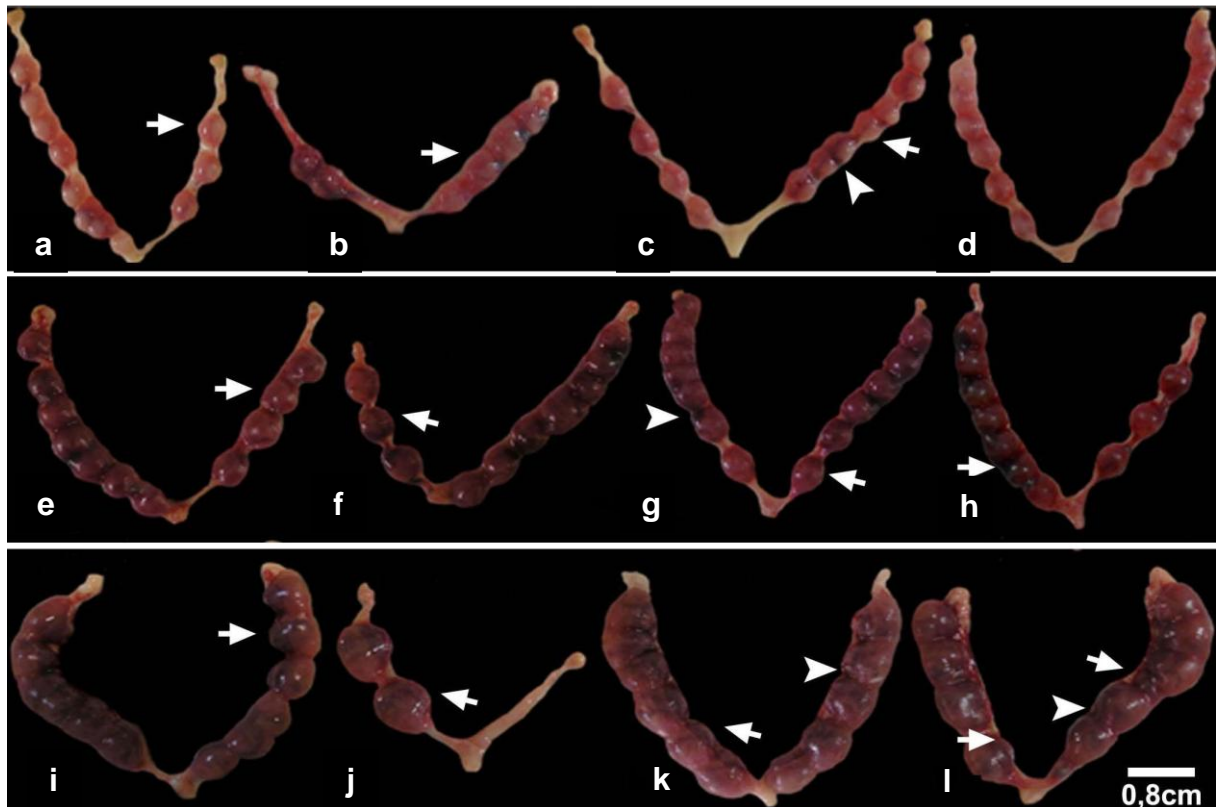


Figura 4 - Imagens macroscópicas de úteros de camundongos no 10^o (a, b, c, d), 12^o(e, f, g, h) e 15^o ddg (i, j, k, l). Sítios de implantação do grupo controle (a, e, i) - Sítios com aspecto normal (setas) , sem sinais de hemorragia no interior dos sítios ou comprometimento da viabilidade dos embriões. Grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg (b, f, j) - Notar sítios de implantação em menor quantidade (setas). Grupo tratado com danazol 7,5 mg/kg (c, g, k) - Sítios com aspecto normal (setas), com poucos sinais de hemorragia entre os sítios (cabeças de seta) semelhante ao encontrado nos controles. Grupo tratado com danazol 75 mg/kg (d, h, l). Notar apenas um sítio diagnosticado como sítios em reabsorção (seta) e sinais de hemorragia entre os sítios (cabeças de seta) equivalentes às dosagens de 0,75, 7,5 e controle.

Fonte: Do autor.

Os números obtidos durante a contagem do total de sítios de implantação embrionária, sítios viáveis, sítios em reabsorção e corpos lúteos, foram utilizados para o cálculo das taxas de implantação, viabilidade e perda embrionária durante a gestação de camundongos.

Quando estudados os parâmetros para cálculo da taxa de implantação embrionária foi possível constatar uma diminuição significativa no número de implantações embrionárias no grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg quando comparado ao controle (Gráfico 9) o que concorda com nossos resultados obtidos na observação macroscópica dos cornos uterinos destes camundongos (Figura 4). Em todos os demais grupos estudados não foram encontradas diferenças significativas na taxa de implantação.

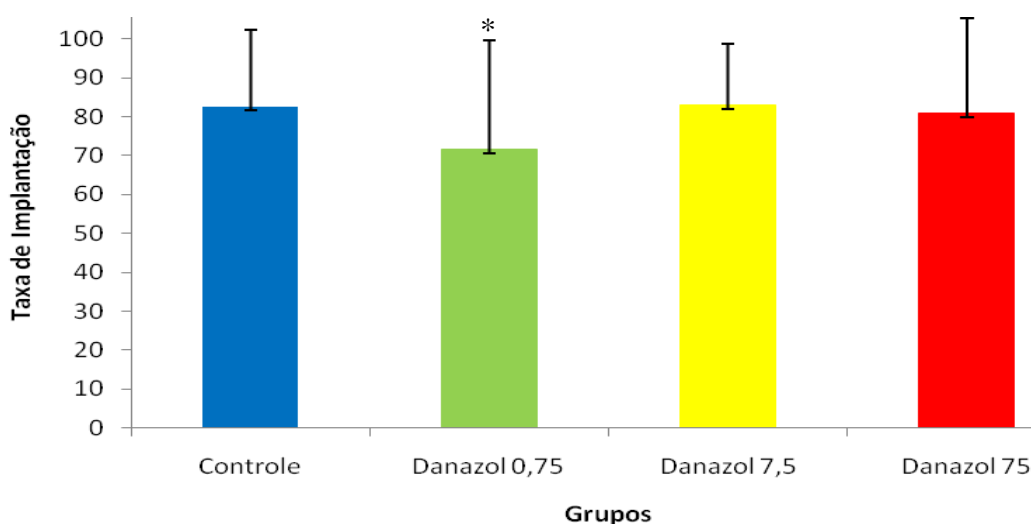


Gráfico 9 – Média das taxas de implantação total em todos os grupos experimentais.
 (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do autor.

Além disso, quando avaliada a taxa de viabilidade embrionária foi possível notar que existia um número menor de embriões viáveis no grupo tratado com danazol 0,75 mg/kg quando comparado aos animais do grupo controle e tratados com danazol 7,5 mg/kg e 75 mg/kg (Gráfico 10, Tabela 4).

Quando analisada a taxa de perda embrionária, foi possível constatar uma diminuição nesta taxa em animais tratados com 0,75 e 7,5 mg/Kg apenas no 15º ddg (Gráfico 11). Interessantemente, do 6º ao 12º ddg não foram observadas alterações na perda embrionária com nenhum tratamento com danazol. É importante salientar que a taxa de perda embrionária é obtida por meio da contagem de sítios de implantação em reabsorção e dos corpos lúteos, ou seja, nossos resultados demonstram que apenas no 12º ddg os sítios em reabsorção puderam ser claramente observados tanto nos animais controle quanto nos animais tratados com danazol. Portanto, os dados obtidos durante a análise da perda embrionária em nosso estudo, indicam que o tratamento com danazol nas concentrações mais baixas diminuiu a perda embrionária fato este diagnosticado apenas após a placentação, ou seja, no 15º ddg.

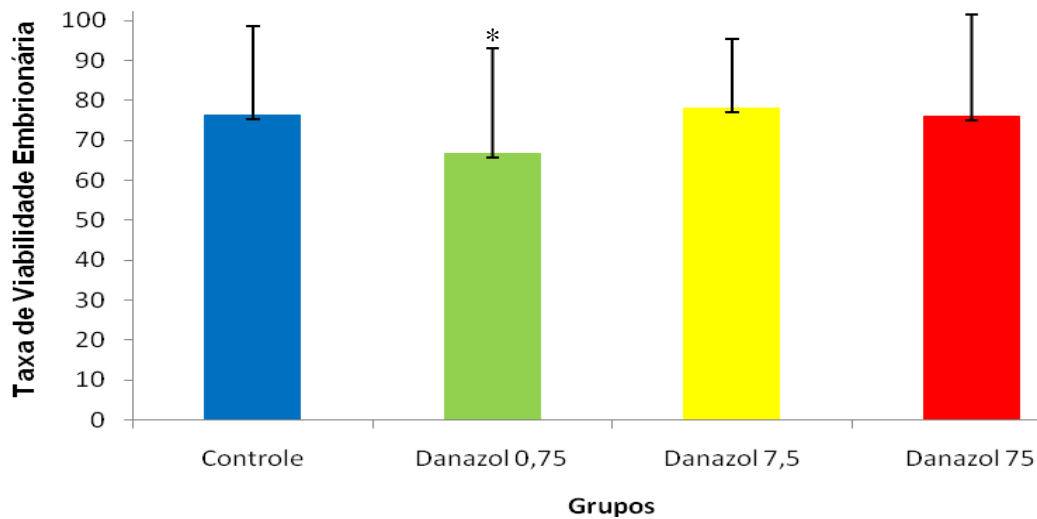


Gráfico 10 – Média das taxas de viabilidade embrionária em todos os grupos experimentais.
 (*) Indica ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Do autor.

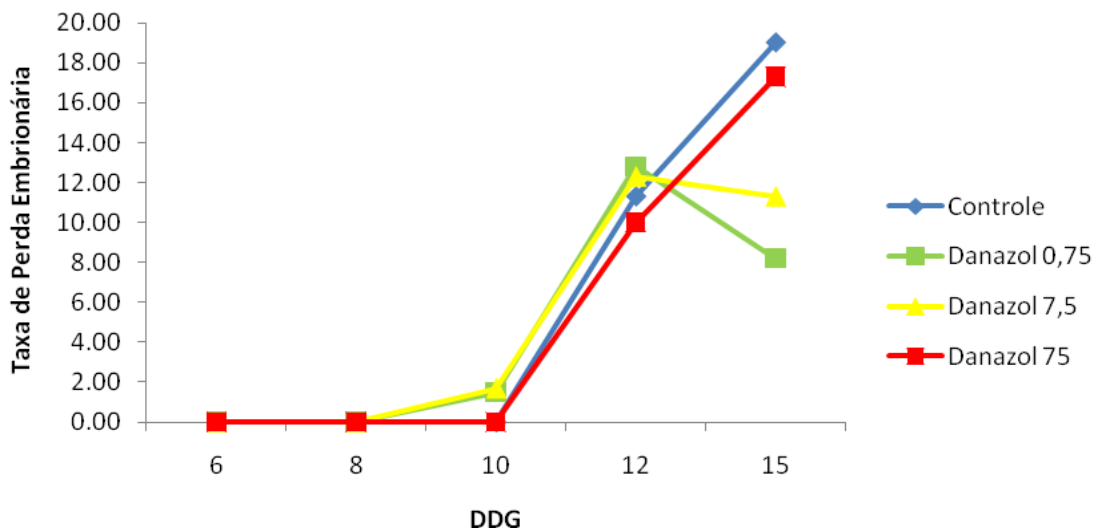


Gráfico 11 – Média das taxas de perda embrionária nos grupos experimentais nos dias de gestação analisados.

Fonte: Do autor.

As taxas de implantação e viabilidade embrionária para os grupos tratados com danazol 7,5 mg/Kg apresentaram-se estatisticamente iguais às obtidas para o grupo controle. Os resultados obtidos com o tratamento de 7,5 mg/Kg de danazol corroboram aqueles apresentados por Kusakabe et al. (2007) que consideraram a dose de 7,5 mg/kg de danazol apropriada por alterar apropriadamente as condições internas do útero, através de efeitos hormonais. Segundo estes autores, a dose de

7,5 mg/kg de danazol também mostrou uma melhora na prenhez, além de apresentar efeitos colaterais menores quando comparados às doses mais altas.

A diminuição significativa nas taxas de implantação e viabilidade nos grupos tratados com a menor dose de danazol quando comparados ao controle sugere sua ação direta na janela de implantação embrionária. Portanto, apesar desse hormônio ser utilizado para o tratamento da endometriose, sua ação dose-dependente sobre a janela de implantação deve ser considerada quando se objetiva o aumento da fertilidade.

Em nosso estudo foram também realizadas análises sob o microscópio de luz de cortes histológicos submetidos à citoquímica de lectina DBA de sítios de implantação embrionária dos camundongos do grupo controle e tratados com danazol. Nestes espécimes foi possível identificar os 4 subtipos das células natural killer uterinas caracterizados por Paffaro Jr et al. (2003) (Figura 5).

O subtipo 1 das células natural killer uterinas apresentou aspecto linfóide, sendo pequena em diâmetro, sem grânulos citoplasmáticos e com núcleo contendo predominantemente heterocromatina (Figura 5A). O subtipo 2 dessas células apresentou diâmetro maior do que a anterior e possuía grânulos citoplasmáticos (Figura 5B). O subtipo 3 era muito maior em diâmetro, apresentava muitos grânulos citoplasmáticos e núcleo predominantemente com eucromatina (Figura 5C). O subtipo 4 representava o estágio de senescência dessas células com conteúdo granular variável e grandes regiões lembrando extração citoplasmática (Figura 5D).

Não foram observadas alterações no padrão de reatividade da lectina DBA para estas células, descrito por Corrêa da Silva (1997) e Paffaro Jr et al. (2003). Também não foram encontradas alterações em seus grânulos e na superfície celular. Estudos recentes demonstraram que em certas situações as células uNK podem ter seu padrão de reatividade para lectina DBA modificado em resposta a uma situação de estresse como a infecção por LPS e por lesão mecânica intrauterina do embrião (ZAVAN, 2011; LIPPE, 2007; ROMAN, 2001; LIPPE, 2007). Tais alterações foram descritas como sugestivas da ativação da atividade citotóxica destas células. No entanto, o tratamento com danazol não causou estas alterações o que sugere fortemente que este hormônio sintético não atua direta ou indiretamente em células natural killer uterinas para ativar sua citotoxicidade.

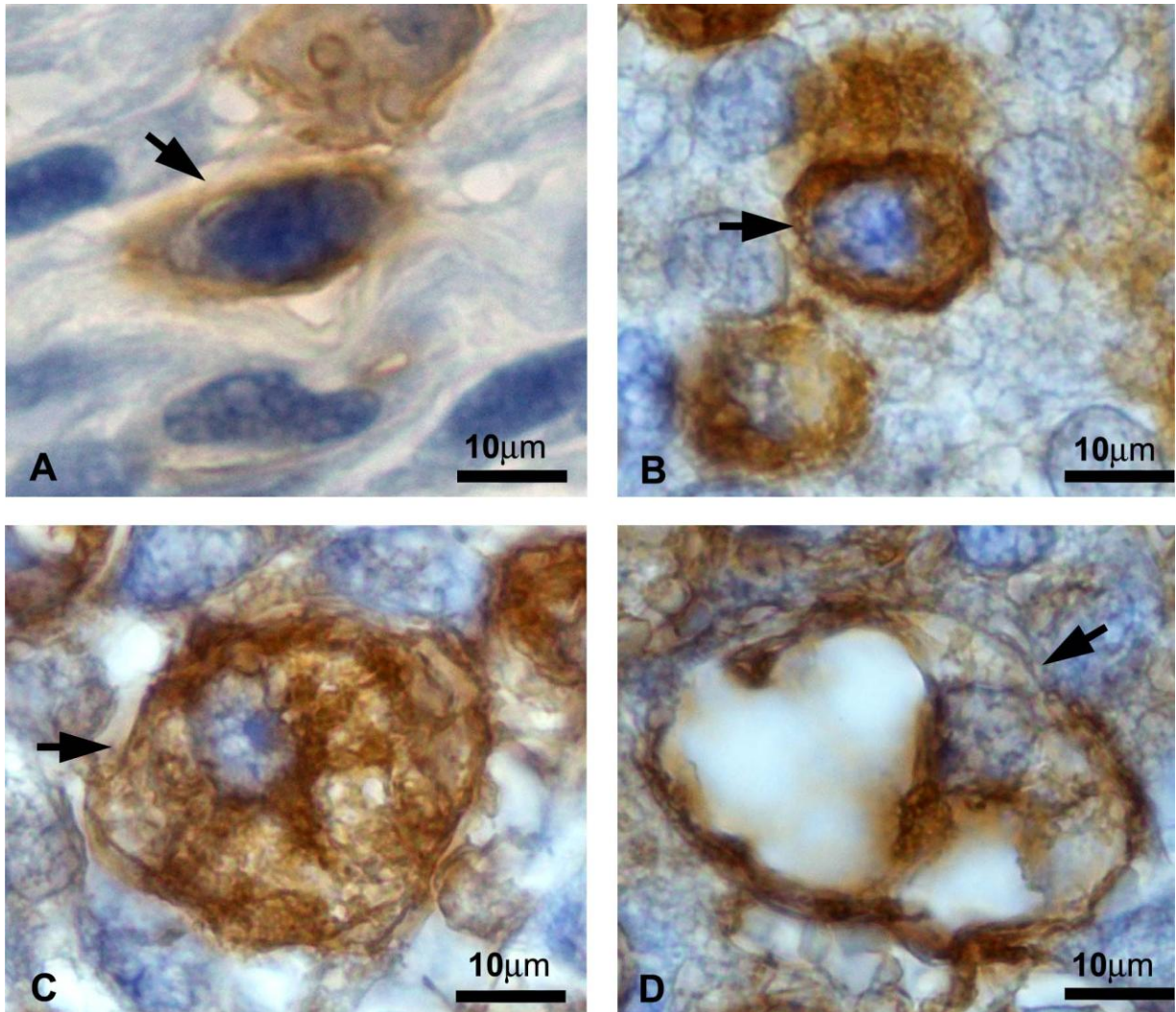


Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação de camundongos no 10^o ddg. Notar as células imaturas do subtipo 1 (A) e subtipo 2 (B) e aquelas diferenciadas pertencentes ao subtipo 3 (C) e senescentes do subtipo 4 (D). Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

Foi feita a análise morfológica dos sítios de implantação no 6^o, 8^o, 10^o, 12^o e 15^o ddg. Durante este estudo morfológico foi possível observar que comparado com animais do grupo controle (Figura 6A), os sítios de implantação de camundongos no 6^o ddg tratados com a menor (Figura 6B) e com a maior (Figura 6D) dosagem de danazol eram menores. No entanto, a camada do miométrio nestes animais estava aparentemente maior quando comparada ao controle. Por meio da análise detalhada dos sítios de implantação de animais tratados com 0,75 de danazol foi observado que a decídua apresentava-se menos desenvolvida do que nos animais controle e não foram encontradas células uNK DBA reativas nestes animais. Os sítios de implantação que mais se assemelhavam aos controles tanto no tamanho, na espessura do miométrio, quanto na decidualização, foram aqueles

provenientes de animais tratados com a dose de 7,5 mg/Kg (Figura 6C). Tanto em animais tratados com 7,5 mg/Kg quanto naqueles tratados com 75 mg/Kg foram encontradas células uNK DBA reativas.

De acordo com Abrahamsohn e Zorn (1993), a decidualização é um fenômeno que começa imediatamente após a implantação do blastocisto, o qual ocorre em camundongos por volta do 5º ddg. Este fenômeno envolve a diferenciação de células uterinas do tipo fibroblasto em células epitelióides que formam um novo tecido no útero durante a prenhez e que recebeu o nome de decídua. Estas células começam a exibir nucléolo evidente, hipertrofiam, formam junções citoplasmáticas umas com as outras e uma grande redução do conteúdo de matriz extracelular é notada ao redor destas células (LUNDKVISK, 1978; ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). A decídua é muito importante durante a gestação, sendo que ela permite a instalação segura do blastocisto no endométrio, nutre o embrião nos estágios e controla a invasividade das células trofoblásticas gigantes (De FEO, 1967; FINN, 1977; ABRAHAMSOHN, 1983; BILLINGTON, 1971; KATZ, 1995; KIRBY; COWELL, 1968; FINN 1971). O atraso na decidualização, processo induzido em grande parte pela progesterona (GELLERSEN; BROSENS, 2003; BRAR et al., 1997) foi observado no grupo tratado com danazol 0,75 mg/Kg e pode ser explicado pela ligação deste hormônio em receptores de progesterona, quando em dosagens mais baixas (MORGANTE et al., 1999).

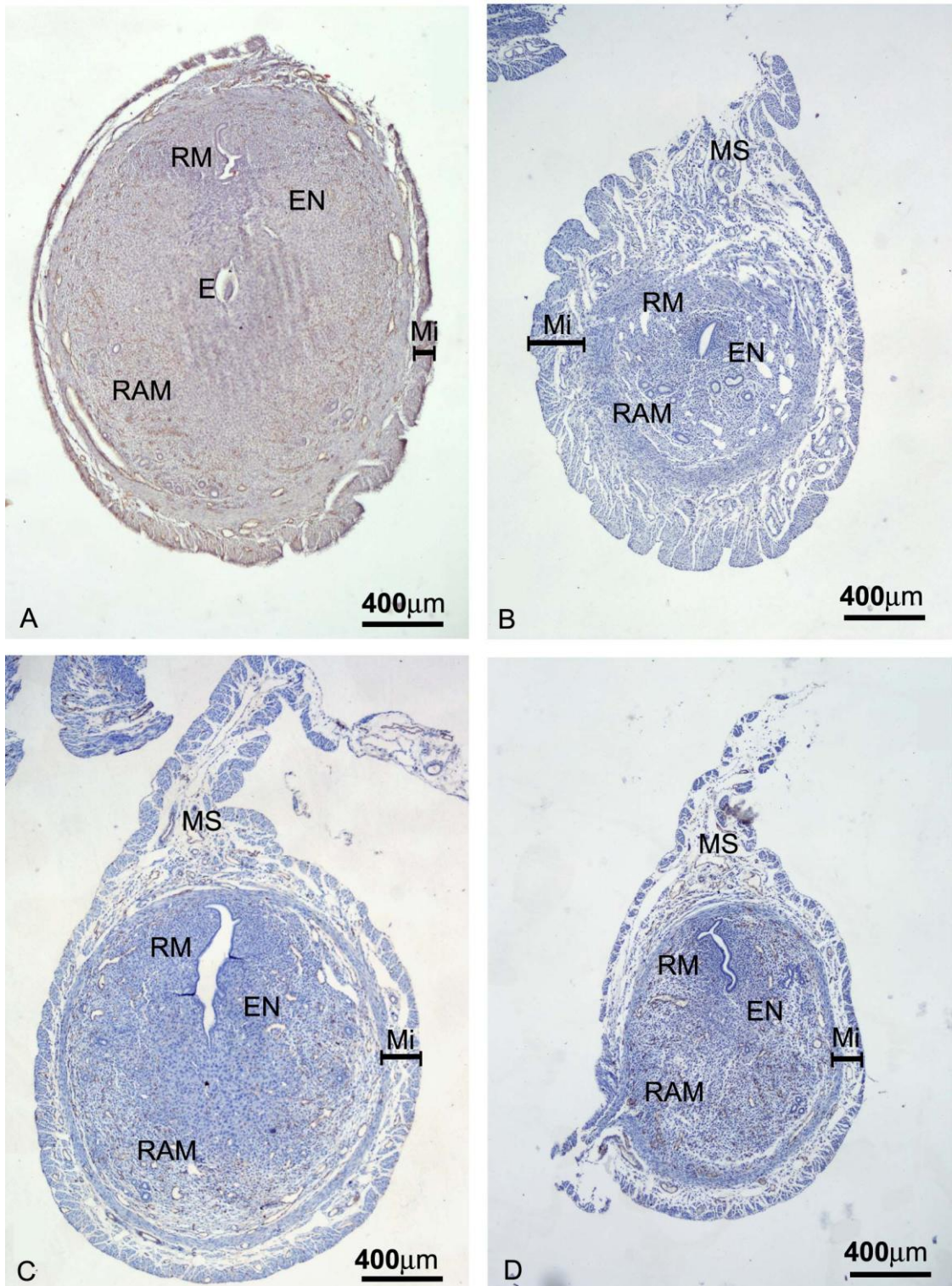


Figura 6 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 6^o ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/Kg e com tamanho menor (B) e miométrio mais espesso (Mi). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg de aspecto normal (C). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg de tamanho menor (D). Embrião (E). Mesométrio (MS). Região Mesometrial (RM). Região antimesometrial (RAM). Endométrio (EN) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

No 8º ddg foram notadas células uNK DBA reativas em todos os animais analisados, controles e tratados (Figura 7A e D). Os sítios de implantação dos animais tratados com 0,75 (Figura 7B) continuavam menores que os dos animais controle, porém a camada do miométrio tinha aspecto normal em todos os animais tratados e não foram notados indícios de atraso na decidualização nos camundongos neste dia de gestação.

Quando comparados aos sítios de implantação de camundongos controle (Figura 8A), ao contrário dos sítios de animais tratados no 6º e 8º ddg, os sítios de implantação de animais tratados no 10º ddg não eram menores (Figura 8B e C). Sob o microscópio de luz, estes sítios possuíam inúmeras células uNK à semelhança do que foi observado nos animais controle no mesmo dia de gestação. No entanto, após análise detalhada destes sítios de implantação, foram observadas células grandes e de citoplasma basófilo (Figura 8D). Estas células se assemelhavam às células trofoblásticas gigantes, no entanto, não foram utilizados marcadores em nosso estudo que comprovassem a identidade destas células. Estas células grandes nos animais tratados formavam cordões muito espessos ao redor dos vasos sanguíneos, fazendo com que o diâmetro destes se tornasse aparentemente maior que os descritos em camundongos normais (CROY et al., 2003^a; CROY et al., 2003^b) (Figura 8E). A partir do 10º ddg, em todos os animais, foram notados sob a microscopia de luz alguns sítios de implantação com embriões em reabsorção em sítios que demonstravam moderada hemorragia (Figura 8F). A frequência destes sítios com embriões em reabsorção foi equivalente à frequência dos mesmos, sob análise macroscópica (Tabela 4).

No 12º e 15º ddg em animais tratados com danazol os sítios de implantação continuavam a apresentar tamanhos (Figura 9B) equivalentes ao controle (Figura 9A). No entanto, a partir do 12º ddg foi notado um aparente atraso na placentação em animais tratados com danazol na concentração de 7,5 mg/Kg. Os cortes histológicos das placentas destes animais apresentavam traves de células placentárias espessas e indiferenciadas semelhantes às encontradas em animais no 10º ddg (Figura 9C). Esta desorganização do espongiotrofoblasto e labirintotrofoblasto em animais tratados com danazol 7,5 mg/Kg a partir do 12º ddg e a ocorrência de grandes áreas contendo células indiferenciadas em meio ao labirinto trofoblasto, não concordavam com a morfologia da placenta normal de

camundongos descrita na literatura (PEEL; BULMER, 1977; MUNTENER; HSY, 1977; GEORGIADES et al., 2001).

Além disso, nos animais tratados com danazol 7,5 mg/Kg no 12^o e 15^o ddg, continuaram sendo observadas grandes células semelhantes às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos (Figura 9D e E). A ocorrência destas células nestes dias de gestação sugere que danazol, nesta concentração, é capaz de aumentar a invasividade das células trofoblásticas gigantes que são descritas como células com função de invadir o endométrio, conseguindo espaço para o crescimento do embrião, por meio de sua alta invasividade; e nutrição do embrião, por meio de seu potencial fagocítico (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2010; AMARANTE-PAFFARO et al., 2010).

No 12^o e 15^o ddg continuaram sendo observados embriões em reabsorção com frequência equivalente à obtida pela análise macroscópica (Tabela 4). De fato, danazol parece não aumentar, em nenhuma concentração, a perda embrionária, fato este evidenciado pela análise macroscópica, microscópica e das taxas de perda embrionária.

No entanto, como referido anteriormente, de acordo com estudos de Morgante et al. (1999) baixas doses de danazol fazem com que o mesmo não se ligue aos receptores de estrógeno, mas provocam a ligação estável desse hormônio aos receptores para andrógenos e progesterona. A ligação aos receptores de progesterona, característico da farmacologia de danazol em dosagens baixas, pode agir diminuindo a implantação embrionária e a viabilidade fetal. Esta ligação pode explicar também o atraso na decidualização observado neste grupo, já que o processo de decidualização, de acordo com Franco et al. (2011) é induzido em grande parte pela progesterona.

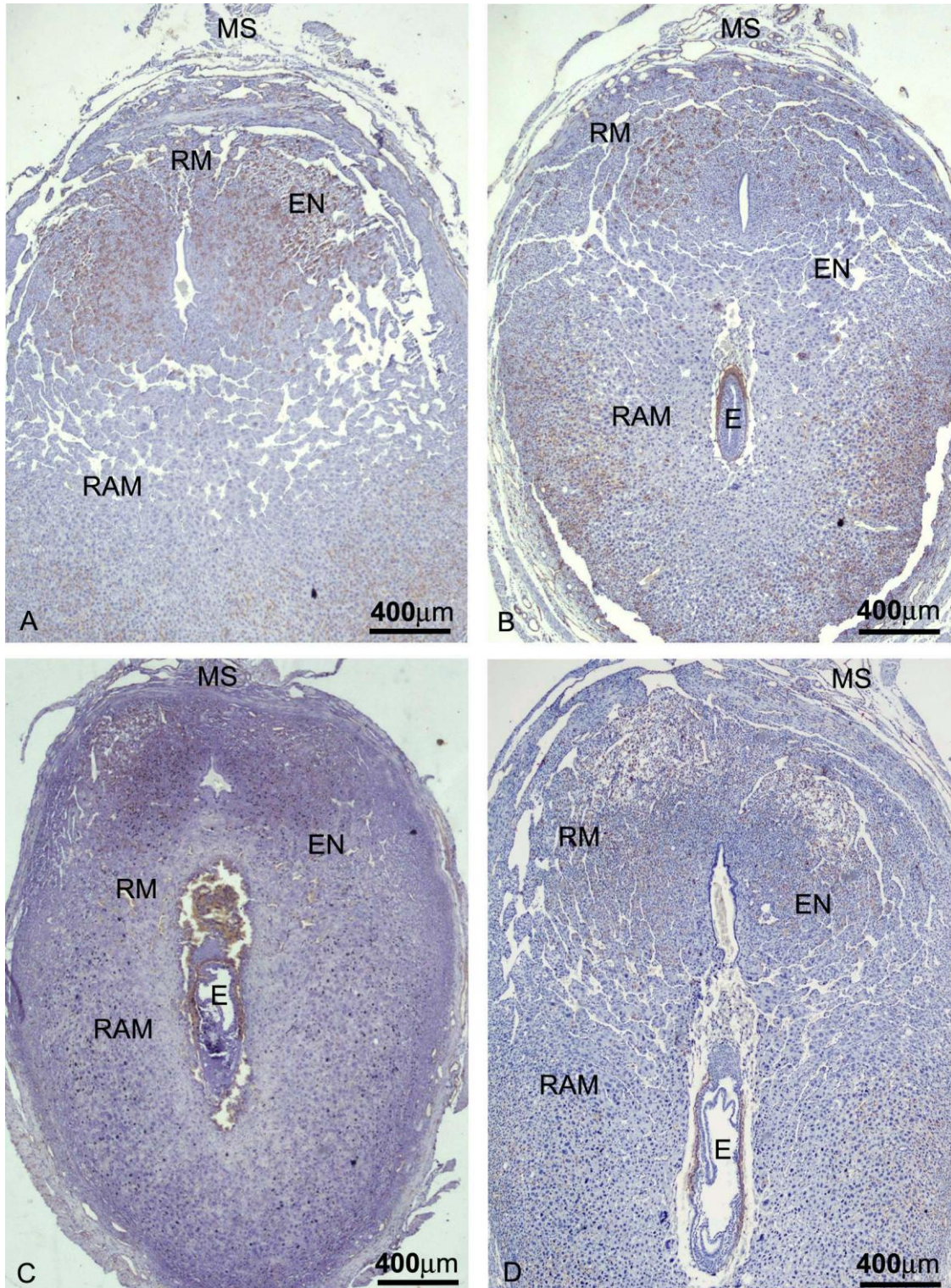


Figura 7 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 8^o ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/Kg e com tamanho menor (B). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg (C). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg (D). Embrião (E). Mesométrio (MS). Região Mesometrial (RM). Região anti-mesometrial (RAM). Endométrio (EN) Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

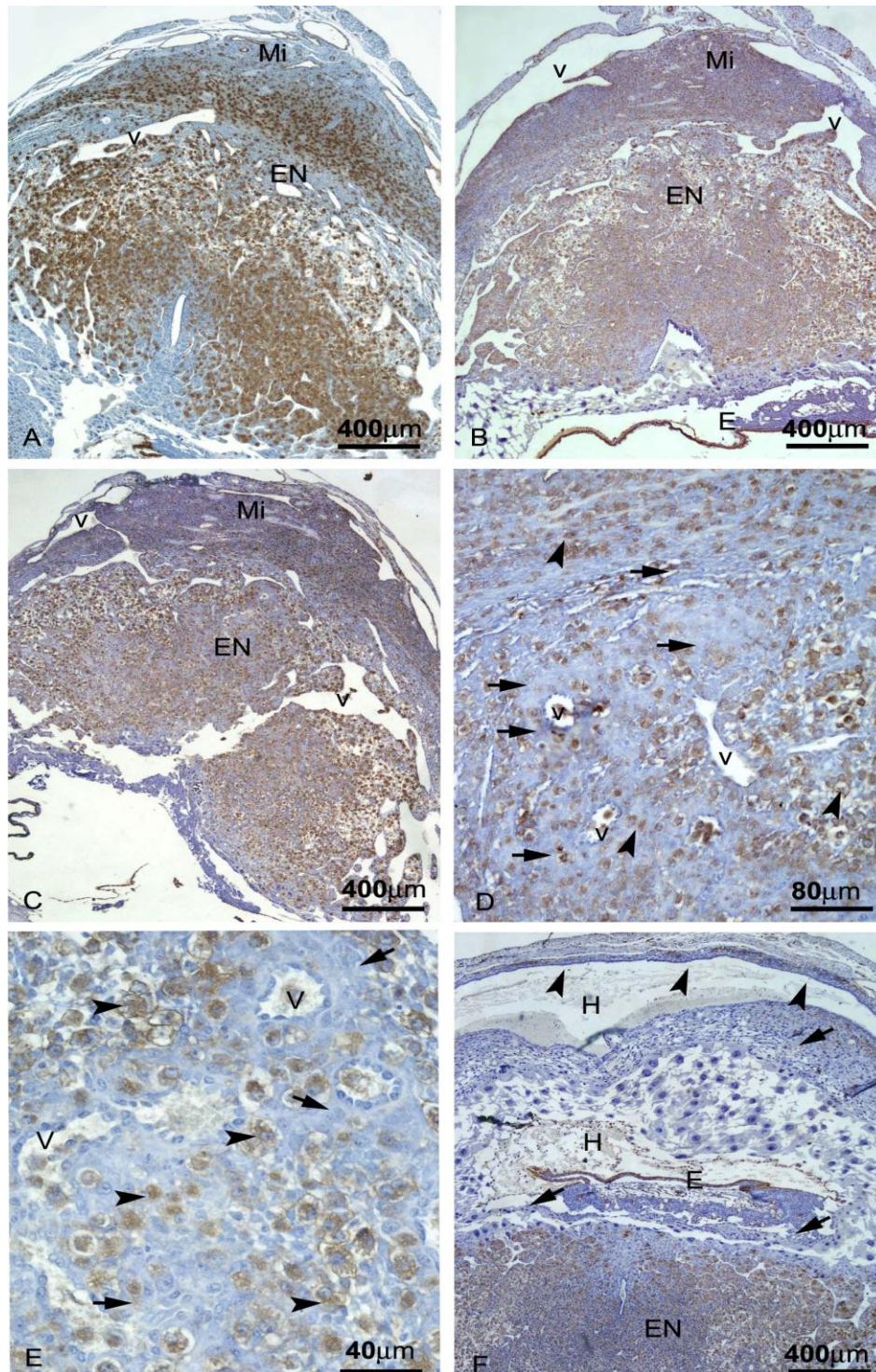


Figura 8 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 10^o ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/kg com aparência normal (B). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg com muitas células semelhantes às células trofoblásticas ao redor de vasos (C). Detalhe de C com células semelhantes às trofoblásticas formando cordões espessos ao redor dos vasos (D) (setas) e células uNK (cabeças de seta). Detalhe de D com células tipo trofoblasto (setas) e células uNK (cabeças de seta) (E). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg com embrião morto (F) em sinais de intensa hemorragia. Embrião (E). Mesométrio (MS). Endométrio (EN). Hemorragia (H). Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

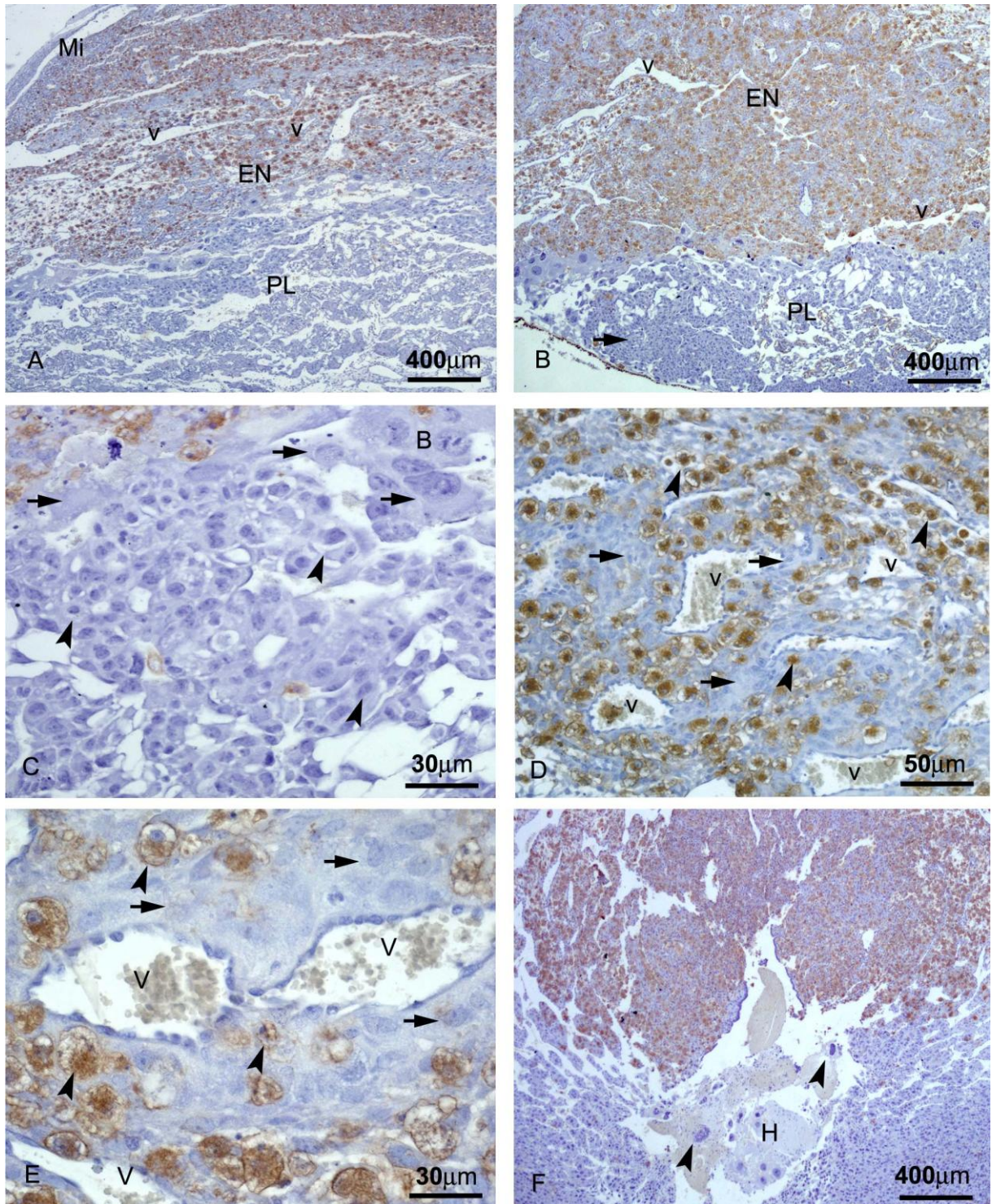


Figura 9 - Fotomicrografias de cortes histológicos de sítios de implantação no 12º ddg. Sítio de implantação controle (A). Sítio de implantação de camundongo tratado com 0,75 mg/kg onde a placenta parecia pequena e com ilhas de células trofoblásticas indiferenciadas (seta) (B). Detalhe de B mostrando células indiferenciadas onde já deveria existir labirintotrofoblasto (C). Sítio de implantação de camundongo tratado com 7,5 mg/Kg com muitas células semelhantes às células trofoblásticas (setas) ao redor de vasos (D) e células uNK (cabeças de seta). Detalhe de D com células semelhantes às trofoblásticas formando cordões espessos ao redor dos vasos (E) (setas) e células uNK (cabeças de seta). Sítio de implantação de camundongo tratado com 75 mg/Kg (F) com embrião morto em sinais de intensa hemorragia. Embrião (E). Miométrio (Mi). Endométrio (EN). Placenta (PL). Vaso (V). Hemorragia (H). Lectina DBA-Peroxidase-DAB e Hematoxilina de Harris.

Fonte: Do autor.

Durante a avaliação da influência das diferentes concentrações de danazol sobre o número total de células uNK reativos à lectina DBA, foi observado que o número de células uNK foi menor que o encontrado em animais do grupo controle até o 8º ddg nos animais tratados com 0,75 e 7,5 mg/Kg de danazol (Gráfico 12). Até este dia de gestação, nos animais tratados com 75 mg/Kg de danazol, o número de uNK era semelhante ao controle. A partir do 10º ddg, no entanto, foi observado um aumento significativo no número de células uNK em animais tratados com 7,5 mg/Kg, enquanto em animais tratados com 0,75 mg/Kg estas células continuavam em menor número e nos tratados com 75 mg/Kg o número de uNK diminuiu expressivamente. No 12º ddg, a quantidade total de células uNK manteve distribuição semelhante ao 10º ddg nos animais de todos os grupos, contudo, no 15º ddg o número destas células passou a ser igual estatisticamente.

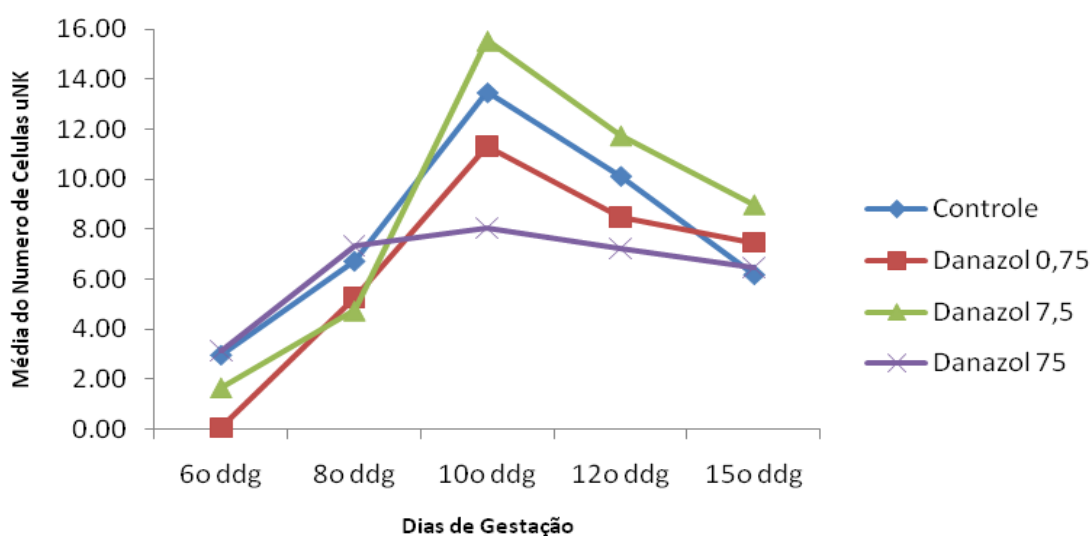


Gráfico 12 - Representação da média total de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações

Fonte: Do autor.

Durante nosso estudo quantitativo dos subtipos de células uNK uterinas DBA reativos em três áreas do útero prenhe de camundongos foi observado que na área 1, mais distante do embrião implantado, as células uNK do subtipo 1, 2, 3 e 4 foram raras nos animais tratados com 0,75 mg/Kg de danazol (Gráfico 13). No entanto, no 10º ddg, nestes animais, o número de uNK do subtipo 1 foi significativamente maior em relação ao controle nesta área, ao passo que as do subtipo 3 e 4 estavam em menor número. No 12º e 15º ddg as uNK do subtipo 4 estavam, significativamente, em menor e em maior número respectivamente e em

relação aos animais controle. Na mesma área, entretanto, nos sítios de implantação embrionária de camundongos tratados com a dosagem de 7,5 mg/Kg foi observada alteração significativa apenas no número de uNK do subtipo 1 no 10º ddg, onde estas se encontravam em maior número e em uNK do subtipo 4 no 15º ddg, onde foram encontradas em maior número em relação aos animais controle. No que diz respeito aos animais tratados com a concentração de 75 mg/Kg, estes apresentaram também maior número de células uNK do subtipo 1 e menores números daquelas do subtipo 3 no 10º dgg. As uNK do subtipo 4 eram maiores em numero no 15º ddg em relação aos controles. Estudos caracterizaram a área 1 como a área de chegada de células uNK uterinas, fenômeno que ocorreria por volta do 5º ddg em camundongos (PAFFARO JR et al., 2003). O aumento em número de células uNK do subtipo 1 nesta área no 10º ddg em todos os grupos de camundongos tratados com danazol, sugere que o tratamento prévio com este esteróide sintético aumenta a migração de células uNK para o útero durante a prenhez.

Na área 2 (Gráfico 14), as células uNK pertencentes ao subtipo 1, 2, 3 e 4 continuaram raras em animais tratados com 0,75 mg/Kg de danazol no 6º ddg. Redução significativa foi observada neste grupo (0,75 mg/Kg) no número de células uNK do subtipo 4 no 8º ddg e 10º ddg. Adicionalmente, um número menor de células uNK do subtipo 3 foi observado no 12º ddg. Não foram encontradas diferenças significativas nos números dos diferentes subtipos de unK no 15º ddg em animais deste grupo na área 2. No que diz respeito aos animais tratados com a dosagem de 7,5 mg/Kg de danazol, foi observado uma redução no número das células uNK do subtipo 3 apenas no 12º ddg. Esta redução foi concomitante a um aumento no número de células uNK do subtipo 4 no 12º e 15º ddg nestes animais. Os animais tratados com 75 mg/Kg, apresentaram grandes alterações no número dos subtipos de células uNK na área 2, sendo o subtipo 1 maior em número no 6º e 8º ddg, enquanto o subtipo 3 estava em menor número no 8º e 10º ddg e o subtipo 4 de uNK era menor em número no 12º e 15º ddg em relação aos animais controle. A área 2 é aquela caracterizada como área de intensa proliferação celular em estudos anteriores em camundongos prenhes normais (PAFFARO JR et al., 2003; CROY et al., 2010). As alterações mais intensas percebidas pela quantificação dos subtipos de uNK em animais tratados com 75 mg/Kg de danazol foram observadas nesta área, nos quais foi observado um maior número de células uNK imaturas (subtipo 1) no 6º ddg e diminuição de formas mais diferenciadas a partir do 10º ddg. De fato,

vários efeitos farmacológicos de danazol já foram descritos, incluindo inibição da liberação de gonadotrofinas, inibição competitiva de enzimas esteroidogênicas, modulação de funções imunológicas e supressão de proliferação celular (FRANCHIMONT; CRAMILION, 1977; BARBIERI et al., 1977; ROSE et al., 1988; VIGANO et al., 1994). Nossos resultados sugerem, portanto, que dosagens excessivas de danazol podem interferir com a proliferação das células uNK diminuindo seu número, o que explica a menor concentração do 8º para o 10º ddg destas células demonstrada durante a quantificação do número total das mesmas neste trabalho (Gráfico 12).

Na área 3, próxima ao embrião, foram observadas as modificações mais significativas no número dos subtipos de uNK. Sendo assim, nos camundongos tratados com 0,75 mg/Kg de danazol, as células uNK dos subtipos 1, 2, 3 e 4 continuaram raras no 6º ddg (Gráfico 15). Foi observado um aumento significativo das células do subtipo 2 no 8º ddg e diminuição no número de uNK do subtipo 3 no 10º ddg. Quanto aos animais tratados com a dosagem terapêutica (7,5 mg/Kg), nesta área foi observado um aumento no número de uNK do subtipo 1, concomitantemente à diminuição das uNK do subtipo 3. No 10º ddg, estes animais apresentaram um maior número de células uNK do subtipo 4 e concomitante diminuição no número das células do subtipo 3 nesta área. No 12º e 15º ddg, as uNK do subtipo 3 continuaram diminuindo em número ao passo que no 15º ddg as uNK do subtipo 4 estavam aumentadas em número em relação aos animais controle. Nos camundongos tratados com 75 mg/Kg de danazol, foi notado um aumento no número de células do subtipo 1 e concomitante diminuição das células uNK do subtipo 3 no 6º ddg. No 8º ddg, tanto o número de uNK do subtipo 1 quanto do subtipo 2 eram maiores em número que nos animais controle. As células uNK do subtipo 3 encontravam-se em menor número a partir do 10º ddg nestes animais, enquanto o número de células do subtipo 4 parecia inalterado nestes animais. Os resultados quantitativos na área 3 revelaram que danazol foi capaz de aumentar o número de formas mais imaturas (subtipo 1 ou 2) de células uNK no início da gestação em todas as dosagens utilizadas. No entanto, a diminuição no número de células do subtipo 3 (mais diferenciadas) e concomitante aumento das formas conhecidas como senescentes (subtipo 4) a partir do 10º ddg, sugerem que este hormônio é capaz de acelerar a diferenciação destas células em regiões próximas ao embrião.

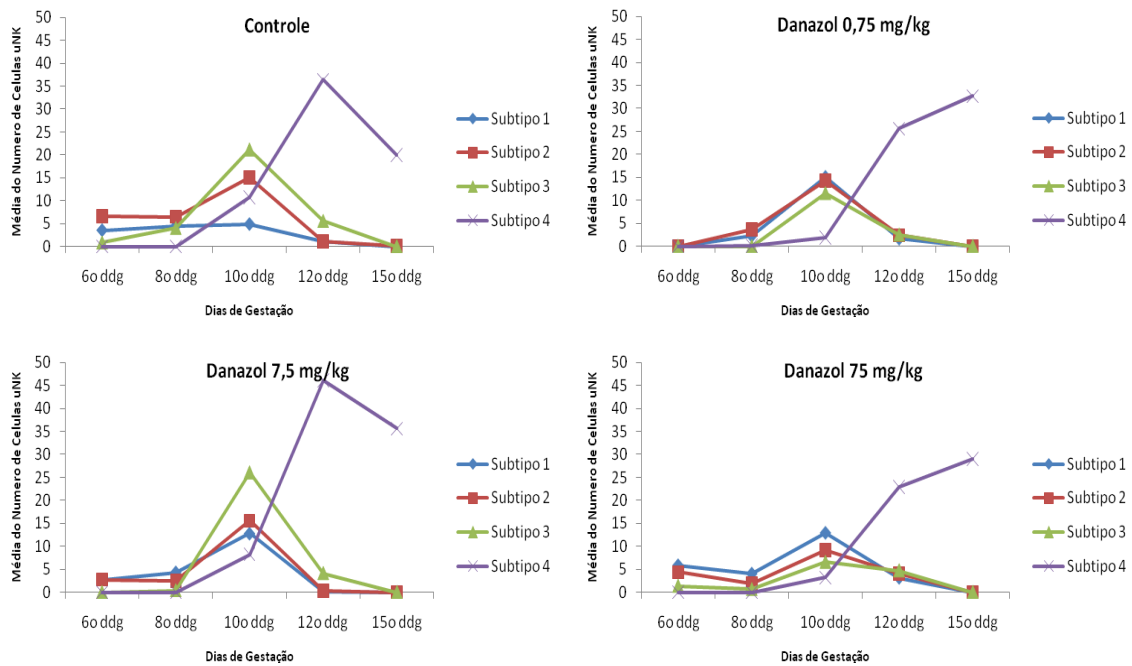


Gráfico 13 - Representação da distribuição na Área 1 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações

Fonte: Do autor.

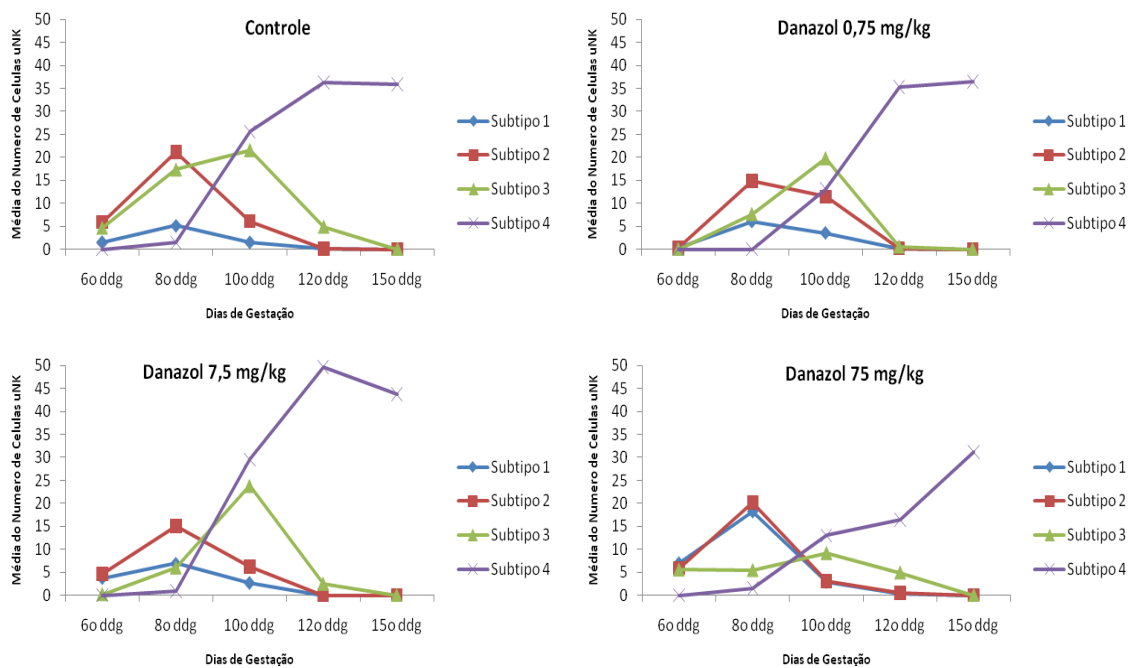


Gráfico 14 - Representação da distribuição na Área 2 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.

Fonte: Do autor.

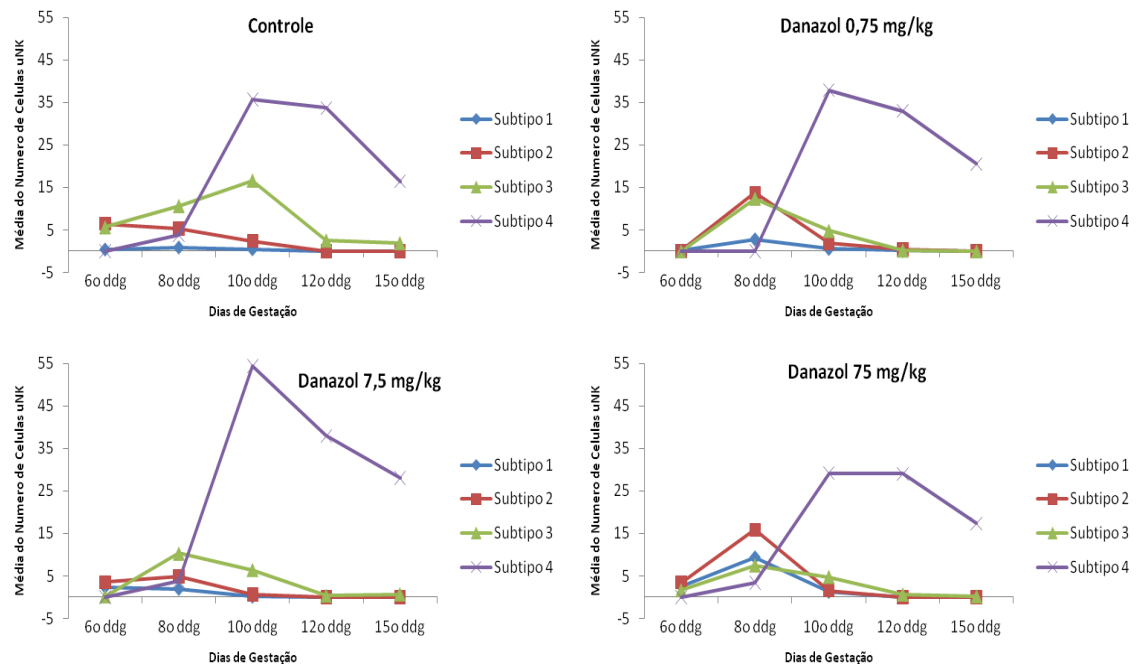


Gráfico 15 - Representação da distribuição na Área 3 dos 4 subtipos de células uNK nos diferentes dias de gestação para os grupos controle e tratados com danazol em diferentes concentrações.

Fonte: Do autor.

6. CONCLUSÕES

Com o conjunto de resultados obtidos no estudo morfológico, citoquímico, estereológico e comportamental de camundongos prenhes submetidos ao tratamento prévio com diferentes concentrações de danazol, podemos concluir que:

- Danazol na dosagem de 0,75 mg/Kg apresentou efeito ansiogênico e diminuiu a retenção de memória de curto prazo no período médio da prenhez de camundongos (10^o ddg). Na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento da retenção de memória a curto prazo e estado equivalente ao depressivo. A diminuição do tempo de exploração global à medida que a concentração do hormônio foi aumentada sugere efeito dose dependente de danazol no estabelecimento de estado de sonolência e apatia em camundongos no 10^o ddg.
- Danazol provocou atraso no período para sucesso da cópula, no entanto, aumentou a taxa de prenhez sem reduzir o número de corpos lúteos em todas as dosagens utilizadas, revelando a eficiência deste hormônio em melhorar a fertilidade em camundongos.
- A dosagem de 0,75 mg/Kg de danazol diminuiu as taxas de implantação e viabilidade embrionária sem contudo aumentar a perda embrionária. Tais resultados revelam que esta dosagem não é a mais adequada para melhora das condições de prenhez de camundongos. As dosagens de 0,75 e 75 mg/Kg de danazol provocaram aparente diminuição dos sítios de implantação, atraso na decidualização e no adelgassamento do miométrio de camundongos, como diagnosticado no 6^o ddg. Nenhuma dosagem de danazol foi capaz de provocar perda embrionária significativa em nossos estudos.
- Nos camundongos tratados com a dosagem 7,5 mg/Kg de danazol foram observadas, a partir do 10^o ddg, muitas células grandes e de morfologia equivalente às células trofoblásticas gigantes ao redor dos vasos que nutrem a decídua e o embrião, o que sugere que esta droga aumenta a invasividade do trofoblasto a partir do período médio da prenhez.

- Não foram observadas mudanças no padrão de reatividade da lectina DBA nos subtipos de uNK de animais tratados com danazol, o que significa que este hormônio não altera a expressão de glicoconjugados contendo n-acetil-galactosamina nestas células.
- Danazol na concentração de 7,5 mg/Kg provocou aumento no número de células uNK, enquanto dosagens menores (0,75 mg/Kg) e maiores (75 mg/Kg) causaram diminuição neste número, demonstrando o efeito dose dependente do danazol no número de células uNK.
- O aumento em número de células uNK do subtipo 1 na área 1 no 10^o ddg em todos os grupos de camundongos tratados com danazol, sugere que o tratamento com este esteróide sintético aumenta a migração de células uNK para o útero durante a gestação. A diminuição no número de células diferenciadas (subtipo 3) em regiões de proliferação (área 2) do útero de camundongos tratados com a dosagem maior de danazol, sugere que esta droga pode prejudicar a proliferação das células uNK em dosagens excessivas. Em áreas próximas ao embrião (área 3) danazol em qualquer dosagem foi capaz de aumentar o número de formas mais imaturas (subtipo 1 ou 2) de células uNK no início da gestação e diminuir o número de uNK do subtipo 3 (mais diferenciadas), concomitantemente ao aumento das formas senescentes (subtipo 4) a partir do período médio da gestação, o que sugere que este hormônio é capaz de acelerar a diferenciação destas células em regiões próximas ao embrião.
- Nossos resultados confirmam os obtidos na literatura de que a dosagem terapêutica de 7,5 mg/Kg de danazol é aquela capaz de modificar a homeostasia uterina melhorando a fertilidade e as condições da prenhez.
- As maiores alterações relacionadas à ansiedade e memória observadas no 10^o ddg, concomitantes às alterações morfológicas nos sítios de implantação embrionária e aumento na proliferação de células natural killer uterinas também neste período, demonstram a integração entre sistemas nervoso, endócrino e imunológico durante a prenhez, que pode ser influenciada de uma maneira dose-dependente pelo tratamento prévio com danazol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; ISHIDA, Y.; IWASAKI, T. Perirhinal N-methyl-d-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 356, p. 191–194, 2004.
- ABRAHAMSOHN, P. A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v.166, p. 263-274, 1983.
- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of Experimental Zoology**, New Haven, v.266, p.603-628, 1993.
- AGHAJANOVA, L.; HAMILTON, A. E.; GIUDICE, L. C. Uterine receptivity to human embryonic implantation: Histology, biomarkers, and transcriptomics. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v.19, p. 204–211, 2008.
- AHMED, A. et al. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its flt-1 receptor in human placenta. **Growth Factors**, Yverdon-Les-Baibs, v.12, p.235–243, 1995.
- ALBRECHT, E. D. et al. Acute temporal regulation of vascular endothelial growth/permeability factor expression and endothelial morphology in the baboon endometrium by ovarian steroids. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v.88, p.2844–2852, 2003.
- ALBRECHT, E. D. et al. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. **Placenta**, London, v.27, p.483–490, 2006.
- ALONSO, S. J. et al. Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. **Physiol. Behav.**, Elmsford, v.49, p. 69–72, 1991.
- ALVES, J. A. G. et al. A Invasão trofoblástica e a sua importância clínica. **Femina**, São Paulo, v.31, n.10, p.881-884, 2003.
- AMARANTE-PAFFARO, A. M. et al. Localization of cathepsins D and B at the maternal-Fetal Interface and the Invasiveness of the trophoblast during the post-implantation period in the mouse. **Cells Tissues Organs**, Basel, 2010. [Epub ahead of print]
- AMARANTE-PAFFARO, A. M. et al. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, Cambridge, v.128, n.2, p.207-218, 2004.

ANCEL, P.; BOUIN, P. Sur l'existence d'une glande myometriale endocrine chez la labpine gestante. Paris, **C.r. Assoc. Anat.**, Nancy, v. 13, p.97–103, 1911.

ANGOLD, A.; WORTHMAN, C. W. Puberty onset of gender differences in rates of depression: a developmental, epidemiologic and neuroendocrine perspective. **J. Affect. Disord.**, Amsterdam, v.29, p. 145–158, 1993.

AOKI, K. et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. **Lancet**, London, v. 345, p.1340-1342, 1995.

APLIN J. D., GLASSER S. R. The interaction of trofoblast with endometrial stroma. In: Endocrinology of embryo-endometrium interactions. GLASSER S. R., MULHOLLAND. **Journal of Psychoyos**, New York, p. 327-341, 1994.

APLIN, J. D. et al. Tissue interactions in the control of trophoblast invasion. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Colchester, v.55, p.57–64, 2000.

ARCK, P. et al. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v.58, p.268-279, 2007.

BADAWY, S. I. F.; GHORAB, M. M.; ADEYEYE, C. M. Characterization and bioavailability of danazol-hydroxypropyl β -cyclodextrin coprecipitates. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.128 , p.45-54, 1996.

BARBIERI, R. L. et al. Danazol inhibits steroidogenesis. **Fertility and Sterility**, New York, v.28, p.809 –813, 1977.

BARBIERI, R. L.; RYAN, K. J. Danazol: Endocrine pharmacology and therapeutic application. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 141 p. 453–463, 1981.

BARINI, R. Modificações hormonais e variações comportamentais na mulher. In: **Encontro Brasileiro de Psicoterapia e Medicina Comportamental**, II, 1994, Campinas. Disponível em: <http://www.barini.med.br>. Acesso em 7 mar. 2011.

BENICE, T. S.; RABER, J. Dihydrotestosterone modulates spatial working-memory performance in male mice. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v.110, n.3, p.902-911, 2009.

BERMAN, K. F. Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positron-emission tomography study in women. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.94, p.8836–8841, 1997.

BERNARD, O. et al. Immunological Studies of Mouse Decidual cells. 1. Membrane Markers of Decidual Cells in the Days after implantation. **Journal of experimental Medicine**, New York, v.148, p. 580-591, 1978.

BEVILACQUA E. M.; FARIA M. R.; ABRAHAMSOHN P. A. Growth of mouse ectoplacental cone cells in subcutaneous tissue. Development of placental-like cells. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v.192, p.382-399, 1991.

BEVILACQUA, E. et al. Trophoblast phagocytic program: roles in different placental systems. **Int. J. Dev. Biol.**, Vizcaya, v.54, n.2-3, p.495-505, 2010.

BILLINGTON, W. D. Biology of the trophoblast. **Adv. Reprod. Physiol.**, New York, v.5, p.27-66, 1971.

BONAGURA, T. W. et al. Suppression of Extravillous Trophoblast Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Uterine Spiral Artery Invasion by Estrogen during Early Baboon Pregnancy. **Endocrinology**, Baltimore, v.149, n.10, p.5078–5087, 2008.

BORK, K.; BYGUM, A.; HARDT, J. Benefits and risks of danazol in hereditary angioedema: a long-term survey of 118 patients. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, St. Paul, v.100, n.2, p.153-161, 2008.

BORZYCHOWSKI, A. M. et al. Functional analysis of murine uterine natural killer cells genetically devoid of oestrogen receptors. **Placenta**, London, v.24, n.4, p.403-411, 2003.

BOUTEILLER, P. L.; PICCINNI, M. P. Human NK cells in pregnant uterus: why There? **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v.59, p.401-406, 2008.

BRAR, A. K. et al. Progesterone dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. **Endocrine**, Totowa, v.6, p.301-307, 1997.

BROSENS, I. A.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet. Gynecol. Annu.**, New York, v.1, p.177–191, 1972.

BROT, M. D.; KOOB, G. F.; BRITTON, K. T. Anxiolytic effects of steroid hormones during the estrous cycle. Interactions with ethanol. **Recent. Dev. Alcohol**, New York, v.12, 243–259, 1995.

BROWN, J.; PAN, A.; HART, R. J. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, v.8, n.12, CD008475, 2010.

BULMER, J., LASH, G. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.42, p.511-521, 2005.

BURKE, S. D. et al. Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice. **Hypertension**, Dallas, v.55, n.3, p.729-737, 2010.

- BURKHARDT, J. K. et al. The lytic Granules of NK cells are dual function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. **J. Cell. Biol.**, New York, v.111, p. 2327-2340, 1990.
- CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v.12, p.336-341, 2000.
- 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**, New York, v. 29 .p 1193-1205, 2005.
- CHADDHA, V. et al. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, Amsterdam, v.9, p.357-369, 2004.
- CHANTAKRU, S. et al. Coordinate regulation of lymphocyte-endothelial interactions by pregnancy-associated hormones. **J. Immunol.**, Baltimore, v.171, p.4011-4019, 2003.
- CHRISTENSEN, H.; LEACH, L.; MACKINNON, A. Cognition in pregnancy and motherhood: prospective cohort study. **British Journal of Psychiatry**, London, v.196, n.2, p.126-132, 2010.
- COLUCCI, F., CALIGIURI M. A., Di SANTO J. P. What does it take to make a natural killer? **Nat. Rev.**, London, v.3, p.413-425, 2003.
- COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 22, p.633–640, 2001.
- CORRÊA DA SILVA, C. R. **Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus Musculus*) prenhes.** 1997. 71f. Dissertação (Mestrado Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- COSTA-PINTO, F. A. et al. Neural correlates of IgE-Mediated Allergy. **Ann.N.Y. Acad.Sci.**, São Paulo, v. 1088, p. 116-131, 2006.
- CROY, B. A. et al. Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol. Biol.**, Totowa, v. 612, p.465-503, 2010.
- CROY, B. A. et al. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J. Reprod. Immunol.**, Limerick, v.59, p.175-191, 2003^a.
- CROY, B. A. et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, Cambridge, v.126, p.149-160, 2003^b.

CROY, B. A. Hasn't the time come to replace the term metrial gland? **J. Reprod. Immunol.**, Limerick, v.42, p.127-129, 1999.

CULLINAN-BOVE, K.; KOOS, R. D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. **Endocrinology**, Baltimore, v.133, p.829–837, 1993.

DANAZOL: capsula. New York: **Sanofi-Synthelabo**, 1996. Bula de Remédio. Disponível em: <http://products.sanofi-aventis.us/danazol/danazol.html>. Acesso em 12 jun. 2010.

DE FEO, V. J. Decidualization. In: WYNN, R. M. (Ed). **Cellular Biology of the Uterus**. Amsterdam: North Holland, 1967, p. 192-291.

DeLEO, V. et al. Danazol administration after gonadotrophin-releasing hormone analogue reduces rebound of uterine myomas. **Human Reproduction**, Oxford, v.11, p.101-104, 1997.

DEY, S. K. et al. Molecular cues to implantation. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.25, p.341-373, 2004.

DICKSON, A. D.; BULMER, D. The fine structure of cells in the rat metrial gland. **J. Anat.**, London, v.108, p.123-133, 1971.

DIMITRIADIS, E. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.11, p.613-630, 2005.

DMOWSKI, W. P. Danazol. A synthetic steroid with diverse biologic effects. **J. Reprod. Med.**, Chicago, v.35, p.69-74; discussion 74-75, 1990.

DODIN, S. et al. Bone mass in endometriosis patients treated with GnRH agonist implant or danazol. **Obstet. Gynecol.**, Hagerstown, v.77, p. 410-415, 1991.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L. C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.26, p.44-62, 2005.

DUNN, C. L.; CRITCHLEY, H. O.; KELLY, R. W. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v.87, p.1898-1901, 2002.

FERRAZ, T. M. **Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FILE P. S. et al. Characterization of phenomenon of 'one-trial tolerance' to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze, **Psychopharmacolog**, Berlin, v.102, p. 98–101, 1990.

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

FINN, C. A. Biology of decidual cells. **Adv. Reprod. Physiol.**, New York, v.5, p.1-26, 1971.

FINN, C. A. The implantation reaction. In: WINN, R. M. (Ed). **Biology of the Uterus**. In: WYNN, R. M., New York: Plenum Press, 1977, p.245-308.

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

FOECKING, E. M. et al. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. **Horm. Behav.**, New York, v.53, n.5, p.673–692, 2008.

FRANCHIMONT, P.; CRAMILION, C. The effect of danazol on anterior pituitary function. **Fertil. Steril.**, New York, v.28, p.814–817, 1977.

FRANCO, H. L. et al. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. **FASEB J.**, Bethesda, v.25, n.4, p.1176-1187, 2011.

FRYE, C. A.; LACEY, E. H. Posttraining androgens enhancement of cognitive performance is temporally distinct from androgens increases in affective behavior. **Cognit. Affect. Behav. Neurosci.**, New York, v.1, p. 172-182, 2001.

FRYE, C. A.; SELIGA, A. M. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. **Cognit. Affect. Behav. Neurosci.**, New York, v.1, p.371-381, 2001.

FRYE, C. A.; WALF, A. A. Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdale can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. **Behav. Neurosci.**, Washington, v.118, p.306-313, 2004.

FUKUI, A. et al. Natural killer cell subpopulations and cytotoxicity for infertile patients undergoing fertilization. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v.41, p.413-422, 1999.

GELLERSEN, B.; BROSENS, J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross talk in human endometrium: a decidualizing affair. **J. Endocrinol.**, London, v.178, p.357-372, 2003.

GEORGIADES, P. et al. Roles of genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.98, p.4522-4527, 2001.

GIBBS, R. B. Testosterone and estradiol produce different effects on cognitive performance in male rats. **Horm. Behav.**, New York, v. 48, p.268-277, 2005.

GIBBS, R. B.; GABOR, R. Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. **J. Neurosci. Res.**, New York, v.74, p.637-643, 2003.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Berlin, v.447, p.175-180, 2003.

GODBOLE, G. et al. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertility and Sterility**, New York, v. 95, n. 4, 2011.

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

HEBBARD, P. C. et al. Two organizational effects of pubertal testosterone in male rats: transient social memory and a shift away from long-term potentiation following a tetanus in hippocampal CA1. **Exp. Neurol.**, New York, v.182, p.470-475, 2003.

HELIGE, C. et al. Trophoblastic invasion and *in vivo*: similarities and differences. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.23, p.2282-2291, 2008.

HENDERSON, T. A. et al. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Philadelphia, v.88, n.1, p.440-449, 2003.

HENDRIE, C. A.; EILAM, D.; WEISS, S. M. Effects of diazepam and buspirone in two models of anxiety in wild voles (*Microtus socialis*). **J. psychopharmacol.**, Thousand Oaks, Abstract Book, A46, 181, 1994.

HOOPER, W. D.; EADIE, M. J.; DICKINSON, R. G. Single oral dose pharmacokinetics and comparative bioavailability of danazol in humans. **Biopharm. Drug Dispos.**, Chichester, v.12, p. 577-582, 1991.

HUGHES, E.; BROWN, J.; TIFFIN, G. Danazol for unexplained subfertility. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v.2, p.1-5, 2009.

JABBOUR, H. N. et al. Endocrine regulation of menstruation. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.27, p.17-46, 2006.

KALKUNTE, S. et al. Evolution of non-cytotoxic uterine natural killer cells. **Am. J. Reprod. Immunol**, New York, v.59, p.425-432, 2008.

KAMMERER, U., VON WOLFF, M., MARKERT, U. R. Immunology of human endometrium. **Immunobiology**, Stuttgart, v.209, p.569-574, 2004.

KANE, N. et al. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by hCG and mediated via the mannose receptor. **Endocrinology**, Baltimore, v.150, n.6, p.2882-2888, 2009.

KATSUKI, Y. et al. Effects of dienogest, a synthetic steroid, on experimental endometriosis in rats. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v.138, n.2, p.216-226, 1998.

KATZ, S. Extracellular and intracellular degradation of collagen by trophoblast giant cells in actue fasted mice examined by electron microscopy. **Tissue and Cell**, Edinburgh, v.27, p.713-721, 1995.

KEENAN, P. A. Prefrontal cortex as the site of estrogen's effect on cognition. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.26, p.577–590, 2001.

KESKIN, D. B. et al. TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. **PNAS**, Washington, v.104, n.9, p.3378-3383, 2007.

KESSLER, R. C. et al. Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: lifetime prevalence, chronicity and recurrence. **J. Affect. Disord.**, Amsterdam, v.29, p.85–96, 1993.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.5, p.112–117, 1975.

KIMBER, S. J. Leukemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. **Reproduction**, Cambridge, v.130, p.131-145, 2005.

KING, A. et al. Human uterine lymphocytes. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.4, p.480-485, 1998.

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

KING, A. Uterine leukocytes and decidualization. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v.6, p.28-36, 2000.

KING, A.; GARDNER, L.; LOKE, Y. W. Evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in uterine mucosal lymphocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v.11, n.5, p.1079-1082, 1996.

KIRBY, D. R. S.; COWELL, T. P. Trophoblast-host interactions. In: FLEISCHMAJER R.; BILLINGHAM, R. E. (eds) **Ephitelial- mesenchymal interactions**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1968. p. 64-77.

KIRWAN, S. E.; BURSHTYN, D. N. Regulation of natural killer cell activity. **Current Opinion Immunology**, Philadelphia, v.19, p. 46-54, 2006.

KITAYA, K. et al. Expression of macrophage inflammatory protein – 1beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. **J. clin. endocrinol. metab.**, Philadelphia, v.88, p. 1809-1814, 2003.

KITAYA, K. et al. Post-ovulatory rise of endometrial CD16(-) natural killer cells: In situ proliferation of residual cells or selective recruitment form circulating peripheral blood. **J. Reprod. Immunol.**, Limerick, v.76, p.45-53, 2007.

KOROL, D. L. Role of estrogen in balancing contributions from multiple memory systems. **Neurobiol. Learn Mem.**, Orlando, v.82, p.309–323, 2004.

KRITZER, M. F. et al. Gonadectomy impairs Tmaze acquisition in adult male rats. **Horm. Behav.**, New York, v.39, p.167-174, 2001.

KUANG, H. et al. Hormonal regulation of uterine natural killer cells in mouse preimplantation uterus. **J. Mol. Histol.**, Dordrecht, v.41, n.1, p.1-7, 2010.

KUSAKABE, K. et al. Effect of danazol on NK cells and cytokines in the mouse uterus. **J. Reprod. Dev.**, Tokyo, v.53, n.1, p.87-94, 2007.

LANIER, L. L. et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.136, p.4480–4486, 1986.

LARKIN, L. H.; FLICKINGER, C. J. Ultrastructure of the metrial gland cell in the pregnant rat. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v.126, p.337-354, 1969.

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

LEVI SETTI, P. E. et al. Implantation failure in assisted reproduction technology and a critical approach to treatment. **Ann. N. Y. Acad. sci.**, New York, v.1034, p.184–199, 2004.

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

LIBRACH, C. L. et al. 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. **J. Cell. Biol.**, New York, v.113, p.437–449, 1991.

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

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

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

LOKE, Y. W.; KING, A.; BURROWS, T. D. Decidua in human implantation. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.10 (Suppl. 2), p.14–21, 1995.

LUCION, A. B. et al. Influence of early postnatal gonadal hormones on anxiety in adult male rats. **Physiol. Behav.**, Elmsford, v.60, p.1419–1423, 1996.

LUNDKVIST, O. Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. **Biol. Reprod.**, New York, v.18, p.306-16, 1978.

MARVAN, M. L.; CHAVEZ-CHAVEZ, L.; SANTANA, S. Clomipramine modifies fluctuations of forced swimming immobility in different phases of the rat estrous cycle. **Arch. Med. Res.**, México, v. 27, 83–87, 1996.

MATSUBAYASHI, H. et al. Leukocyte subpopulation changes in rats with autotransplanted endometrium and the effect of danazol. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v.33, p.301-314, 1995.

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, Oxford, v.36, p.1882-1886, 2004.

McMASTER, M. T.; ZHOU, Y.; FISHER, S. J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. **Semin. Nephrol.**, Philadelphia, v.24, p.540–547, 2004.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v.2, p.656-663, 2002.

MORGANTE, G. et al. Low-dose danazol after combined surgical and medical therapy reduces the incidence of pelvic pain in women with moderate and severe endometriosis. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.14, n.9, p.2371-2374, 1999.

MOSER, G. et al. Endoglandular trophoblast an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with the novel confrontation co-culture models. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.25, p.1127–1136, 2010.

MSELLE, T. F. et al. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. **Clin. Immunol.**, Orlando, v.124, p.69-76, 2007.

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

MUNTENER, M.; HSY, Y. C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anat.**, Basel, v.98, p.241-252, 1977.

MURAKAMI, K. et al. Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis-derived stromal cells by a competitive mechanism. **Fertility and Sterility**, New York, v.86, n.2, 2006.

MUSICH, J. R.; BEHRMAN, S. J.; MENON, K. M. J. Estrogenic and antiestrogenic effects of danazol administration in studies of estradiol receptor binding. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.140, n.1, p.62-69, 1981.

NEGAMI, A. I.; SASAKI, H.; TOMINAGA, T. Therapeutic effects of danazol on endometrial cells may be activated by the presence of extracellular matrix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St Louis, v.169, n.3, p.739-743, 1993.

NIKLAUS, A. L. et al. Effect of estrogen on vascular endothelial growth/permeability factor expression by glandular epithelial and stromal cells in the baboon endometrium. **Biol. Reprod.**, New York, v.68, p.1997–2004, 2003.

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

OLSSON, J. H.; HILLENSJÖ, T.; NILSSON, L. Inhibitory effects of danazol on steroidogenesis in cultured human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, New York, v.46, n.2, p.237-242, 1986.

OTA, H. et al. Effect of danazol on the immunocompetent cells in the eutopic endometrium in patients with endometriosis: a multicenter cooperative study. **Fertility and Sterility**, New York, v.65, p.545-551, 1996.

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

PARR, E. L.; PARR, M. B.; YOUNG, J. D. E. Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. **Biol. Reprod.**, New York, v.37, p.1327-1336, 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. Fertil.**, Cambridge, v. 88, p. 283-294, 1990.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.113, p.227–242, 1990.

PASCHOALINE, M. A. **Fertilização**, 2009. Disponível em: <http://www.slidefinder.net/f/fertilizacao2009/30790131/p5>. Acesso em: 28 fev. 2011.

PEEL, S. Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.**, Berlin, v.115, p.1-112, 1989.

PEEL, S.; STEWART, I; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v.223, p.647-656, 1983.

PEEL, S; BULMER, D. Proliferation and differentiation of the trophoblast in the establishment of the rat chorio-allantoic placenta. **J. Anat.**, London, v.124, p.675-687, 1977.

PHARMACY HEALTH. Danazol. 2003. Disponível em: <http://www.pharmacyhealth.net/d/danazol-2973.htm>. Acesso em 15 abr. 2011.

PIJNENBORG, R. The human decidua as a passage-way for trophoblast invasion. **Trophoblast Res.**, Cambridge, v.11, p.229-241, 1998.

POPOVICI, R. M.; KAO, L. C.; GIUDICE, L. C. Discovery of new inducible genes decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, p.3510-3513, 2000.

PORSOLT, R. O.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Interna. Pharma. Ther.**, Ghent, v.229, p. 327-336, 1977.

RAULET, D. H.; VANCE, R. E.; McMAHON, C. W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.19, p.291-330, 2001.

RED-HORSE, K.; DRAKE, P. M.; FISHER, S .J. Human pregnancy: the role of chemokine networks at fetal-maternal interface. **Exp. Reviews Mol. Med.**, Cambridge, v.6, p.1-14, 2004.

REDLINE, R. W.; LU, C. Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leucocytes in murine placenta: Implications for materno-fetal Immunological relationship. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v.61, p. 27-36, 1989.

REICHE, E.M.; NUNES, S.O.; MORIMOTO, H.K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **Lancet Oncol.**, London, v.5, n.10, p.617-625, 2004.

REX, A.; FINK, H.; MARSDEN, C. A. Effects of BOC-CCK-4 and L365,260 on cortical 5-HT release in guinea pigs on exposure to the elevated plus maze. **Neuropharmacology**, Oxford, v.33, p.559-565, 1994.

REYNOLDS, L. P. et al. Time-course of the uterine response to estradiol-17 in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. **Biol. Reprod.**, New York, v.59, p.613–620, 1998.

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, G. L. et al. The inhibitory effects of danazol, danazol metabolites, gestrinone, and testosterone on the growth of human endometrial cells . **Fertility and Sterility**, New York, v. 49, p.224–228, 1988.

SARAFANA, S. et al. Aspectos da imunologia da gravidez. **Acta Med. Port.**, Lisboa, v. 20, p.355-358, 2007.

SELYE, H. Stress and disease. **Science**, Washington, v.122, p.625-631, 1955.

SELYE, H. Studies on the Physiology of the Maternal Placenta in the rat. **Placenta**. London, 1935.

SHANG, X. L. et al. Effects of synaptic plasticity regulated by 17beta-estradiol on learning and memory in rats with Alzheimer's disease. **Neurosci. Bull.**, Beijing, v.26, n.2, p.133-139, 2010.

SMITH, L. J. Metrial gland and other glycogen containing cells in the mouse uterus following mating and through implantation of the embryo. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v.119, p.15-24, 1966.

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

SPENCER, J. L. et al. Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. **Neuroscience**, Oxford, v. 155, n.4, p. 1106-1119, 2008.

- SPRITZER, M. D. et al. Castration differentially affects spatial working and reference memory in male rats. **Arch. Sex. Behav.**, New York, v.37, n.1, p.19-29, 2008.
- STAUN-RAM, E.; SHALEV, E. Human trophoblast function during the implantation process. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, London, v.3, p.56–67, 2005.
- STEINER, M.; DUNN, E.; BORN, L. Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond. **J. Affective Disord.**, Amsterdam, v.74, p.67-83, 2003.
- STEWART, I.; PEEL, S. Granulated metrial cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. **J. Anat.**, London, v.133, p.535-541, 1981.
- SURREY, E. S.; HALME, J. Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation. **Fertility and Sterility**, New York, v.58, n.2, p.273-278, 1992.
- SZCZYGIET, M.; KURPISZ, M. Chromosomal anomalies in human gametes and pre-implantation embryos, and their potential effect on reproduction. **Andrologia**, Berlin, v.33, p.249–265, 2003.
- TAKEI, F.; BRENNAN, J.; MAGER, D. L. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.55, p.67-77, 1997.
- TAMAYA, T. et al. Danazol binding to steroid receptors in human uterine endometrium. **Fertility and Sterility**, New York, v.41, n.5, p.732-735, 1984.
- TEI, C. et al. Effect of danazol on the pregnancy rate in patients with unsuccessful fertilization-embryo transfer. **J. Reprod. Med.**, Chicago, v.43, p.541-546, 1998.
- THOMAS, G. W. et al. Effects of danazol on endothelial cell function and angiogenesis. **Fertility and Sterility**, New York, v.88, Suppl 2, 2007.
- TRINCHINERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv. Immunol.**, New York, v.47, p.187-376, 1989.
- TROWSDALE, J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. **Immunity**, Cambridge, v.15, p.363-374, 2001.
- VALBUENA, D. et al. Ovarian stimulation and endometrial receptivity. **Hum. Reprod.**, Oxford, v.14(Suppl. 2), p.107–11, 1999.
- VAN DEN HEUVEL, M. J. et al. A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, New York, v.54, p.322-331, 2005.

VAN MOURIK, M. S. M.; MACKLON, N. S.; HEIJNEN, C. J. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v.85, p. 4-16, 2009.

VIGANO, P. et al. Immunosuppressive effect of danazol lymphocyte-mediated cytotoxicity toward human endometrial stromal cells. **Gynecol. Endocrinol.**, Carnforth, v.8, p.13–9, 1994.

VOULLAIRE, L. et al. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. **Mol.Hum.Reprod.**, Oxford, v.8, p.1035-1041, 2002.

WALF, A. A.; RHODES, M. E.; FRYE, C. A. Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized hormone-primed rats. **Neurobiol. Learn. Mem.**, Orlando, v.86, p.35-46, 2006.

WANG, C. et al. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics and the functional role in angiogenesis during pregnancy. **Microscopy Research and Technique**, New York, v.60, p.420-429, 2003.

WEISSMAN, M. M. et al. Sex differences in rates of depression: cross-national perspectives. **J. Affect. Disord.**, Amsterdam, v.29, p.77–84, 1993.

WELLS, M. The pathology of gestational trophoblastic disease: recent advances. **Pathology**, Sidney, v. 39, p.88–96, 2007.

WHITELAW, P. F.; CROY, B. A. Granulated lymphocytes of pregnancy. **Placenta**, London, v.17, p.533–543, 1996.

WILLIAMS, J. B. W. et al. Gender differences in depression in primary care. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.173, p.654–659, 1995.

WU, X. et al. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cell Mol. Immunol.**, New York, v.3, p.131-137, 2006.

YADI, H. et al. Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **J. Immunol.**, Baltimore, , v. 181, p.6140-6147, 2008.

YAMASHITA, S. et al. Antiestrogenic effects of danazol on rabbit uterus. **Gynecol. Obstet. Invest.**, Basel, v.38, n.4, p.245-8, 1994.

YANNIELI, P. C.; KANTEREWICZ, B. I.; CARDINALI, D. P. Daily rhythms in spontaneous and diazepam-induced anxiolysis in Syrian hamsters. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Phoenix, v.54, p.651-656, 1996.

ZAVAN, B. **Estudo Morfofisiológico e comportamental após inflamação induzida pelo Lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação de camundongos.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas pela Sociedade Brasileira de Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

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

ZHOU, Y. et al. Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang 2, PIGF, and VEGF-C. **Dev. Biol.**, Orlando, v.263, p.114–125, 2003.

ZHOU, Y. et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am. J. Pathol.**, New York, v.160, p.1405–1423, 2002.

APÊNDICE A

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO – GRUPO _____					
		FREQUENCIA DE ENTRADAS		TEMPO DE PERMANÊNCIA	
DDG	ANIMAL	Braço Aberto	Braço Fechado	Braço Aberto	Braço Fechado
6°	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
8°	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
10°	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
12°	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
15°	1				
	2				
	3				
	4				
	5				

APÊNDICE B

TESTE DE MEMÓRIA – GRUPO _____						
		EXP GLOBAL (EG)	Teste (T)			RECONHECIMENTO (R _p)
DDG	ANIMAL	A1 + A2	A3	B	A3 + B	(B-A3 / B+A3)
6°	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
8°	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
10°	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
12°	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
15°	1					
	2					
	3					
	4					
	5					

APÊNDICE C

NADO FORÇADO – GRUPO _____		
DDG	ANIMAL	Tempo Estático
6°	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
8°	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
10°	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
12°	1	
	2	
	3	
	4	
	5	
15°	1	
	2	
	3	
	4	
	5	



We certify that

TAVARES, P. E., AMARANTE-PAFFARO A.M., PAFFARO-JR, V. A.

Organizing Committee

Vilma Regina Martins
Estela Bevilacqua
Luiz Fernando Lima Reis
Patrícia Gama
Marinilce F Santos
Chao Yun Irene Yan
Marimélia Porcionatto
Flávia A Gomes
Silvana Allodi

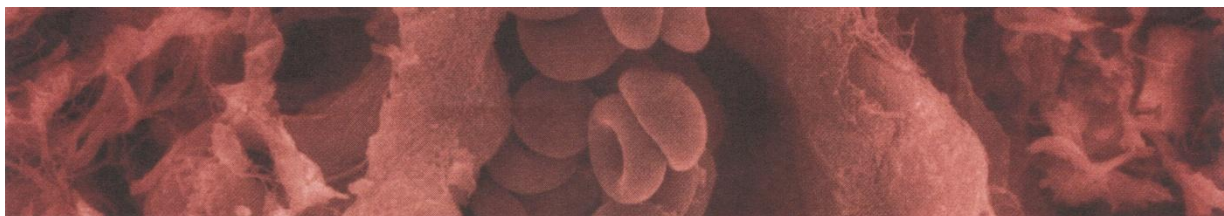
presented the Poster entitled

Morphofisiologic changes in pregnant mice after prior treatment with danazol

at the XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held in São Paulo, Brazil on July 24-27th, 2010.

**President
Organizing Committee
SBBC 2010**

ANEXO




FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 05.002 intitulado ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS APÓS TRATAMENTO PRÉVIO COM DANAZOL de autoria Tavares, E. P., Amarante-paffaro, A. M., Giusti-paiva, A., Paffaro Jr, V. A. - Depto de Ciências Biomédicas, UNIFAL-MG Faculdade de Odontologia, UNIFENAS, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.



Comissão Organizadora





V Seminário em Interação Materno-Fetal Pesquisa Básica & Clínica em Biologia da Reprodução

Certificado

Tavares EP; Salles ESL, Lima PNT; Amarante-Paffaro AM; Giusti-

Paiva A; Paffaro Jr. VA participaram do **V Seminário em Interação Materno-Fetal: Pesquisa Básica & Clínica em Biologia da Reprodução**, realizado nos dias 15 e 16 de outubro de 2010 na Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, apresentando o trabalho: Morphophysiological and behavioral aspects of mice pregnancy after prior treatment with danazol.

São Paulo, 16 de Outubro de 2010.

Comissão Organizadora

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA