



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



**Évila da Silva Lopes Salles**

**DIETA HIPERLIPÍDICA PROVOCA ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS  
E FUNCIONAIS NO ÚTERO DAS GERAÇÕES PARENTAL E F1  
PRENHES.**

Alfenas-MG  
2019

ÉVILA DA SILVA LOPES SALLES

**DIETA HIPERLIPÍDICA PROVOCA ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E  
FUNCIONAIS NO ÚTERO DAS GERAÇÕES PARENTAL E F1 PRENHES.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutora em Ciências  
Fisiológicas pela Universidade Federal de  
Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro  
Junior.

Alfenas-MG  
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S168d Salles, Évila da Silva Lopes.  
Dieta hiperlipídica provoca alterações fenotípicas e funcionais no útero das gerações parental e F1 prenhes. / Évila da Silva Lopes Salles – Alfenas/MG, 2019.  
155 f.: il. --  
Orientador: Valdemar Antonio Paffaro Junior.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. 1. Dieta Hiperlipídica. 2. Desenvolvimento Fetal. 3. Células Matadoras Naturais. 4. Linfócitos. I. Paffaro Junior, Valdemar Antonio. II. Título.

CDD-573.6

ÉVILA DA SILVA LOPES SALLES

**DIETA HIPERLIPÍDICA PROVOCA ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS E FUNCIONAIS NO ÚTERO DAS GERAÇÕES PARENTAL E F1 PRENHES.**

A banca-examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia da reprodução.

Aprovada em: 07/02/2019

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Mara Sandra Hoshida

Instituição: USP-SP

Assinatura: *Mara S Hoshida*

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: *Luiz Felipe L. Coelho*

Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat

Instituição: UNICAMP

Assinatura:

*MFC*

Dedico a Deus, por todo amor e cuidado; aos meus pais, João Batista e Lázara e aos meus irmãos, Débora e João Pedro, por serem apoio, amor e paciência; e ao meu orientador, Prof. Dr. Valdemar P. Junior, pelo exemplo de ética e caráter profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo cuidado durante toda a caminhada, por cada oportunidade oferecida e pelas incontáveis bênçãos durante estes 4 anos.

Aos meus pais, João Batista e Lázara, por me incentivarem desde pequena a buscar o conhecimento, por me ensinarem a ser responsável, dedicada e capaz de realizar meus objetivos.

A minha irmã Débora e ao meu cunhado Régis, por serem companheiros e modelo de perseverança, dedicação e de busca pelos seus objetivos.

Ao meu irmão João Pedro, por ser ombro amigo sempre que preciso e pelo exemplo de coragem desde criança.

À minha avó Therezinha e ao meu tio José Carlos, pelas orações e por toda a paz e carinho em que encontro em vocês todos os dias.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior, por ter sido presente e amigo durante estes 10 anos de minha formação. Agradeço a atenção, a dedicação, os ensinamentos profissionais e conselhos paternais.

A Profa. Dra. Andrea Paffaro por sua contribuição na minha formação acadêmica e pessoal, pelo exemplo de mulher e profissional e pelo colo materno durante todos esses anos.

Aos alunos de Iniciação Científica Paulo Fernando Calstrom e Raíne Paiva, por terem contribuído de maneira efetiva para a realização deste trabalho e também por todo o carinho, amizade e respeito.

Às professoras Dra. Marisa Ionta e Dra. Márcia Bizinotto por contribuírem de maneira efetiva na minha formação acadêmica e profissional, pelo carinho, amizade e risadas.

Aos professores Dr. Alexandre Giusti Paiva e Dra. Fabiana Vilela Giusti, obrigada pelos momentos de felicidade e carinho, por terem sido mestres, amigos e família durante todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Babak Baban, Aneeq Malik, Dr. Hesam Khodadadi e Dra. Golnaz Emami pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional. Agradeço pela oportunidade, ensinamentos e a amizade nos meses em que estive nos Estados Unidos.

À Kelli Agee, Melissa Hammac e Michelle Burnside, pela solicitude, por se preocuparem com meu bem-estar e por todo o carinho, obrigada por serem grandes amigas.

Ao Dr. Cesar Pucci, a Carolina Pucci, Julia Pucci, Dr. Fabiano Calmasini, Juliana Calmasini, Dra. Fernanda Priveiro, Leonardo Priveiro e Caroline Auersvald, por terem sido como uma família para mim nos Estados Unidos. Agradeço imensamente todo o carinho, suporte e atenção, vocês contribuíram muito para que esta fosse uma das melhores experiências da minha vida.

As minhas amigas Sarah Valeriano, Glaucia de Lima Moreno, Deborah Elzita e Michele Molina, sei que independente do tempo e da distância posso contar com cada uma de vocês e saibam que podem sempre contar comigo.

Ao meu amigo e “irmão” Prof. Dr. Bruno Zavan, obrigada por todo o exemplo de amor ao ensino e pesquisa durante estes 10 anos e por mostrar a cada dia que “sorte” é a união da dedicação com saber aproveitar as oportunidades.

Ao meu amigo e colega de laboratório Renato Horvath, agradeço pelos bons e maus momentos que enfrentamos juntos. Com você aprendi sobre profissionalismo, autodomínio e que os grandes amigos podem estar onde menos esperamos.

Ao meu amigo Fernando Felicioni, obrigada pelo carinho, pela troca de

experiências e pelo incentivo nesses quase 10 anos de convivência.

À Jéssica Mafra, por ter sido umas das melhores amigas que Alfenas me deu, mesmo em tão pouco tempo de convivência você me deu algumas das melhores risadas que dei na vida.

Ao meu amigo, Breno Vilas Boas. Obrigada pelo lar, pelos inúmeros cafés da tarde, pelas conversas reflexivas e o olhar atencioso.

Aos meus amigos e colegas de laboratório e pós-graduação pelos momentos de convivência e alegria.

Às funcionárias do LABAInt, Neusa Hipólito e Isabel Passos, pelos abraços carinhosos, pelos sorrisos, cuidado e amizade. Vocês são grandes responsáveis pela alegria e leveza do laboratório.

À técnica do LABAInt, Juliana Ramos Martins, pelo exemplo de austeridade no cumprimento de suas responsabilidades.

Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL-MG, por terem contribuído para a realização deste trabalho.

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

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e de doutorado sanduiche no exterior, as quais me possibilitaram grande desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao coordenador local do PMPGCF Prof. Dr. Gionavi Galdino, obrigada pela solicitude e encorajamento na realização do meu estágio de doutorado sanduíche no exterior.

À secretária do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências

Fisiológicas, Adriana Pereira, pelo carisma e preocupação diária com os alunos.

À Universidade Federal de Alfenas por contribuir com a realização deste trabalho e por ter sido minha casa nos últimos 10 anos.

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

*“...eu sou o SENHOR, teu Deus, Deus zeloso,  
que visito a iniquidade dos pais nos filhos até a  
terceira e quarta geração...”*

*Êxodo 20:5*

## RESUMO

Atualmente sabe-se que obesidade e o consumo de dieta rica em gordura estão relacionados a falha reprodutiva e ao evento de programação fetal e acredita-se que as células imunológicas presentes no útero gravídico possam estar relacionadas a estes eventos. Dentre as células imunes uterinas destaca-se a atividade das Células Linfóides Inatas (uILC), em especial as células uNK DBA<sup>+</sup>. Essas células são como sentinelas da interface materno-fetal, pois são capazes de reconhecer e responder às mais variadas alterações do organismo materno, além de terem papel importante nos processos de decidualização, implantação e formação da placenta.

A hipótese deste trabalho é que o consumo de dieta hiperlipídica (HL) durante a gestação possa afetar o ambiente uterino e a biologia das células uNK, além de promover o evento de programação fetal resultando na alteração do ambiente uterino e das células uNK da geração F1 prenhe.

Para a realização deste estudo foram utilizadas 90 fêmeas de camundongos Swiss, as quais acasalaram com machos da mesma linhagem. Na manhã após acasalamento, as fêmeas que apresentaram tampão vaginal foram divididas em 2 grandes grupos os quais consumiram as dietas do 1º dia de gestação (ddg) ao momento da eutanásia: MRC (mães com ração controle) e MHL (mães com ração HL). 45 fêmeas MRC e 45 fêmeas MHL foram eutanasiadas no 6º, 10º e 14º ddg. Foram realizadas análises de ganho de peso, área de tecido adiposo perigonadal, viabilidade gestacional, morfologia e estereologia das células uNK, imunofluorescência para perforina e caspase-3 clivada, análise de expressão gênica de perforina, granzima B, Ly49A, Ly49B, interferon gama (IFN $\gamma$ ), Fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (VEGF $\alpha$ ), Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Toll Like receptor 4 (TLR4), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ 1), Interleucina-17a (IL-17a) e Supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS 3) na decídua basal uterina e análise das uILC por citometria de fluxo. Foram também utilizadas 12 fêmeas MRC e 12 MHL que consumiram a dieta durante toda a gestação para dar origem as proles controle (F1RC) e HL (F1HL). No 2º dia pós-natal (DPN) as proles foram padronizadas em 8 a 10 filhotes, sendo o número de fêmeas sempre igual ao número de machos, e foi realizado também o procedimento de

*fostering* (adoção). Foi analisado o ganho de peso e comprimento naso-anal das fêmeas F1 do 2° ao 60°DPN em dias alternados. A partir dos 60°DPN as fêmeas foram acasaladas com machos não parentais e eutanasiadas no 10°ddg. As fêmeas F1 prenhes foram avaliadas quanto ao ganho de peso durante a gestação, viabilidade gestacional, morfologia e estereologia das células uNK, imunofluorescência para perforina e caspase 3-clivada e análise de expressão de perforina na decídua materna.

Os resultados mostraram que o grupo MHL teve ganho de peso e aumento da área do tecido adiposo significativos, foram encontradas na decídua dessas fêmeas células uNK DBA<sup>low</sup> nas 3 regiões dos SI no 10° e 14°ddg, bem como, grânulos não reativos ao anti-perforina e aumento na incidência de células positivas para caspase 3-clivada. Foi observado também aumento na expressão de perforina e granzima e redução na expressão de Ly49A, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-17a no 6°ddg. No 14°ddg houve diminuição na expressão de VEGF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e SOCS 3.

No grupo F1HL ocorreu redução do crescimento pós-natal e aumento do índice de Lee no 60°DPN. Foi observado também aumento significativo do peso e da área média do tecido adiposo e do índice de Lee no 10°ddg. No mesmo dia foi constatada grande quantidade de células uNK DBA<sup>low</sup>, redução na marcação para perforina e aumento da incidência de células positivas para caspase 3-clivada na decídua, bem como redução significativa na expressão de perforina.

Sendo assim, pode-se concluir que o consumo de dieta rica em gordura durante a gestação desencadeia, não só alterações no ambiente uterino materno, mas também promove o evento de programação fetal gerando na prole alterações muito semelhantes às observadas nas mães que consumiram a dieta.

Palavras-chave: Dieta Hiperlipídica. Desenvolvimento Fetal. Células Matadoras Naturais. Linfócitos.

## ABSTRACT

It is known that obesity and the consumption of a high fat diet are related to reproductive failure and to the fetal programming event and that the immune cells present in the pregnant uterus may be involved in these events. Among the uterine immune cells, the activity of the uterine Innate Lymphoid Cells (uILC) is highlighted, especially the uNK DBA<sup>+</sup> cells. These cells are like sentinels of the maternal-fetal interface, since they are able to recognize and respond to the most varied alterations of the maternal organism, besides having an important role in the processes of decidualization, implantation and formation of the placenta.

The hypothesis of this study is that the consumption of high-fat diet (HF) during gestation can affect the uterine environment, the uNK cells biology and promoted event of fetal programming, resulting in the alteration of uNK cells of F1 generation pregnant.

Ninety females of Swiss mice mated with males of the same lineage. On the morning when the vaginal plug was detected the females were divided into 2 groups which consumed the diets from the 1<sup>st</sup> day of gestation (gd) up to the moment of euthanasia: MCD (mothers fed with control diet) and MHF (mothers fed with high-fat diet). 45 MCD and 45 MHF females were euthanized at 6<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> gd. It was analyzed the weight gain, adipose tissue area, gestational viability, uNK cells morphology and stereology, perforin and caspase-3 cleaved immunofluorescence, gene expression of perforin, granzyme B, Ly49A, Ly49B, interferon gamma (IFN $\gamma$ ), vascular endothelial growth factor  $\alpha$  (VEGF $\alpha$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Toll Like receptor 4 (TLR4), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) Growth factor (TGF- $\beta$ 1), Interleukin-17a (IL-17a) and Cytokine 3 signaling suppressor (SOCS 3) in the basal decidua and analysis of uILC by flow cytometry. It was also used 12 MCD and 12 MHF animals that were fed with the diets during the whole gestation to obtain the control (F1CD) and HF (F1HL) offspring. On the 2<sup>nd</sup> postnatal day (PND) the offspring were standardized in 8 to 10 pups, the number of females always equal the number of males, and the fostering procedure was also performed. The weight gain and naso-anal length of the offspring were analyzed. After the 60<sup>th</sup> PND the females were mated with non-parental males and were euthanized at 10<sup>th</sup> gd. Pregnant females were

evaluated for gestational weight gain, gestational viability, uNK cells morphology and stereology, immunofluorescence for perforin and 3-cleaved caspase, and analysis of perforin expression in the maternal decidua.

The results showed that the MHF group had significant weight gain and increase of the adipose tissue area, in the decidua of these females were found a large number of uNK DBA<sup>low</sup> cells and non-reactive perforin cells in the 3 regions of SI at 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> gd and increase in the number of 3-cleaved caspase positive cells. The gene expression showed an increase of perforin and granzyme mRNA levels and low expression of Ly49A, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and IL-17 $\alpha$  at the 6<sup>th</sup> gd. At 14<sup>th</sup> gd there was a decrease in the expression of VEGF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and SOCS3.

In the F1HF group there was a reduction in postnatal growth and an increase in the Lee index in the 60<sup>th</sup> PND. Significant increase in weight and mean area of adipose tissue and the Lee index at 10<sup>th</sup> gd were also observed. On the same day a large number of DBA<sup>low</sup> uNK cells, a decrease in perforin positive cells and an increase in the incidence of 3-cleaved caspase positive cells in the decidua were observed as well as a significant reduction in perforin expression.

Thus, it can be concluded that consumption of a high-fat diet during pregnancy triggers not only changes in the maternal uterine environment, but also promotes the fetal programming event, generating in the offspring changes very similar to those observed in the mothers who consumed the diet.

Key words: Diet, High-Fat. Fetal Development. Killer, Cells Natural. Lymphocytes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT-	Área teste
DB-	decídua basal
Ddg-	Dias de gestação
En-	Endométrio
F1HL-	Prole hiperlipídica
F1RC-	Prole controle
GAPDH-	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HL-	Hiperlipídica
IDO-	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- $\gamma$ -	Interferon gama
IL-	Interleucina
ILC-	Células linfoides inatas
KIR-	Receptor do tipo imunoglobulina das células Natural Killer
L-	luz uterina
Ly49A-	receptor Ly49A
Ly49B-	receptor Ly49B
MHC-	Complexo principal de histocompatibilidade
MHL-	Mães ração hiperlipídica
Mi-	Miométrio
MRC-	Mães ração controle
NK-	Células Natural Killer
pAMPK-	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada
PL-	Placenta

R1-	região 1
R2-	região 2
R3-	região 3
SI-	subtipo I de célula uNK DBA <sup>+</sup>
SII-	subtipo II de célula uNK DBA <sup>+</sup>
SIII-	subtipo III de célula uNK DBA <sup>+</sup>
SIV-	subtipo IV de célula uNK DBA <sup>+</sup>
SOCS3-	Supressor da sinalização de citocinas 3
TGF- $\beta$ 1-	Fator de crescimento transformador beta 1
TLR4-	Toll like receptor 4
TNF $\alpha$ -	Fator de necrose tumoral $\alpha$
uILC-	Uterine Innate Lymphoid Cells
uNK-	Células Natural Killer uterinas
Vegf $\alpha$ -	Factor de crescimento endotelial vascular $\alpha$

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Divisão das 3 regiões de análise das células uNK.....	50
Figura 2-	Análises de ganho de peso e morfométrica do tecido adiposo perigonadal materno.....	59
Figura 3-	Análise macroscópica dos cornos uterinos e sítios de implantação dos grupos MHL e MRC no 6°, 10° e 14°ddg.....	61
Figura 4-	Análise microscópica dos sítios de implantação dos grupos MHL e MRC no 6°, 10° e 14°ddg.....	64
Figura 5-	Fotomicrografia dos subtipos de células uNK DBA <sup>+</sup> e o subtipo DBA <sup>low</sup> .....	66
Figura 6-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6°ddg do grupo MRC.....	67
Figura 7-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6°ddg do grupo MHL.....	68
Figura 8-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10°ddg do grupo MRC.....	69
Figura 9-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10°ddg do grupo MHL.....	70
Figura 10-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14°ddg do grupo MRC.....	71
Figura 11-	Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14°ddg do grupo MHL.....	72
Figura 12-	Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA <sup>+</sup> nos grupos MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg.....	74
Figura 13-	Imunofluorescência para perforina do grupo MRC no 10°ddg.....	76
Figura 14-	Imunofluorescência para perforina do grupo MHL no 10°ddg.....	77
Figura 15-	Análise imuno-histoquímica para caspase-3 clivada no sítio de	78

	implantação de fêmeas MRC e MHL no 10°ddg.....	
Figura 16-	Análise da expressão gênica da decídua de MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg.....	83
Figura 17-	Análise por citometria de fluxo das células uILC no sítio de implantação de fêmeas ICR MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg.....	87
Figura 18-	Análise do ganho de peso da geração F1 virgem e prenhe.....	90
Figura 19-	Análise dos cornos uterinos e sítios de implantação dos grupos F1HL e F1RC no 10°ddg.....	93
Figura 20-	Análise histoquímica de lectina DBA no sítio de implantação do grupo F1RC no 10°ddg.....	95
Figura 21-	Análise histoquímica de lectina DBA no sítio de implantação do grupo F1HL no 10°ddg.....	96
Figura 22-	Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA <sup>+</sup> e do subtipo DBA <sup>low</sup> .....	97
Figura 23-	Imunofluorescência para perforina no sítio de implantação de fêmeas F1HL no 10°ddg.....	99
Figura 24-	Imunofluorescência para perforina no sítio de implantação de fêmeas F1HL no 10°ddg.....	100
Figura 25-	Análise da expressão gênica para perfroina em fêmeas F1RC e F1HL no 10°ddg.....	101
Figura 26-	Imunofluorescência para caspase-3 clivada no sítio de implantação de fêmeas F1RC e F1HL no 10°ddg.....	102

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
2.1	DIETA HIPERLIPIDICA E GESTAÇÃO.....	23
2.2	PROGRAMAÇÃO FETAL.....	26
2.3	CÉLULAS LINFOIDES INATAS.....	29
2.4	CÉLULAS NATURAL KILLER.....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
4.1	ANIMAIS.....	44
<b>4.1.1</b>	<b>Universidade Federal de Alfenas-Brasil</b> .....	44
<b>4.1.2</b>	<b>Universidade de Augusta- estados Unidos</b> .....	44
4.2	DIETAS.....	45
4.3	ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
<b>4.3.1</b>	<b>Obtenção das mães hiperlipídicas e controle</b> .....	45
<b>4.3.2</b>	<b>Obtenção da prole hiperlipídica e controle</b> .....	46
4.4	ANÁLISE DO GANHO DE PESO DAS FÊMEAS PRENHES.....	47
4.5	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL.....	47
4.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	48
<b>4.6.1</b>	<b>Processamento para embebição em parafina</b> .....	48
<b>4.6.2</b>	<b>Quantificação da adiposidade abdominal</b> .....	48
<b>4.6.3</b>	<b>Citoquímica com lectina DBA (Dolichos biflorus agglutinin)</b>	49
<b>4.6.4</b>	<b>Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica</b> .....	50
<b>4.6.5</b>	<b>Imunofluorescência para Perforina e marcação com lectina DBA</b> .....	51
<b>4.6.6</b>	<b>Imunofluorescência para Caspase 3-clivada e marcação com lectina DBA</b> .....	52
4.7	ESTUDO MOLECULAR.....	53
<b>4.7.1</b>	<b>Extração do RNA total</b> .....	53
<b>4.7.2</b>	<b>Obtenção do cDNA</b> .....	53

4.7.3	<b>qRT-PCR</b> .....	53
4.8	ANÁLISE DAS CÉLULAS LINFOIDES INATAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (EUA).....	56
4.9	AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO NASO-ANAL DAS FÊMEAS DAS NINHADAS DE F1RC e F1HL.....	56
4.10	ÍNDICE DE LEE DA GERAÇÃO F1.....	56
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
5.1	ANÁLISE DO GANHO DE PESO MATERNO.....	60
5.2	ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL DOS GRUPOS MRC E MHL.....	60
5.3	ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DAS CÉLULAS UNK.....	65
5.4	ANÁLISE DE IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	75
<b>5.4.1</b>	<b>Análise de imunofluorescência para perforina</b> .....	<b>75</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Imunofluorescência para caspase-3 clivada</b> .....	<b>77</b>
5.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	80
5.6	ANÁLISE DAS CÉLULAS ILCs POR CITOMETRIA DE FLUXO.	84
5.7	ANÁLISE DO GANHO DE PESO DA PROLE.....	88
5.8	ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL DE F1.....	91
5.9	ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DAS CÉLULAS UNK DE F1.....	94
5.10	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA NO SÍTIO DE IMPLANTAÇÃO DE FÊMEAS F1.....	98
<b>5.10.1</b>	<b>Análise de imunofluorescência e de PCR quantitativo para perforina</b> .....	<b>98</b>
<b>5.10.2</b>	<b>Análise Imuno-histoquímica para caspase-3 clivada</b> .....	<b>101</b>
6	DISCUSSÃO.....	103
7	CONCLUSÕES.....	119
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>121</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Células Linfóides Inatas uterinas, incluindo as células Natural Killer uterinas, são uma população de células linfóide que tem grande importância durante a gestação de camundongos e humanos. Elas auxiliam desde o processo de implantação, no início da gestação, bem como na manutenção da decídua, desenvolvimento da placenta e homeostase do ambiente uterino.

Em 2003, Paffaro e colaboradores estabeleceram a técnica de citoquímica de lectina DBA (dolichos biflorus agulitinina) como principal ferramenta de estudo das células uNK em camundongos. Posteriormente, Zhang e colaboradores (2011), utilizando também a técnica de coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS) identificaram duas subpopulações de células uNK no útero de camundongos prenhes, as células uNK PAS<sup>+</sup>DBA<sup>+</sup> e as células uNK PAS<sup>+</sup>DBA<sup>-</sup>, sendo as células DBA<sup>+</sup> as mais abundantes no meio da gestação.

Estudos realizados à cerca da biologia das células uNK DBA<sup>+</sup> têm mostrado que estas células possuem papel importante na interface-materno fetal, não só auxiliando nos eventos recorrentes de uma gestação normal, como também respondendo a estímulos que podem ser entendidos como insultos à gestação. Foi verificado que as células uNK DBA<sup>+</sup> alteram sua morfologia e função frente à eutanásia embrionária cirúrgica, injeção intraperitoneal de LPS, administração de quimioterápicos e medicamentos, alterações nutricionais durante a gestação, entre outros eventos e promovem alteração do ambiente uterino buscando promover a manutenção da gestação.

Foi constatado, por exemplo, que o consumo de dieta hiperlipídica (HL) e hipercalórica (HC) durante a gestação promove diminuição na quantidade dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> e leva ao aparecimento de elevado número de células uNK alteradas, pouco reativas à lectina DBA e com grânulos de aspecto vazios, as quais são denominadas uNK DBA<sup>low</sup>. Além da baixa reatividade à lectina DBA, essas células perderam a marcação para perforina em seus grânulos e a sua reatividade à marcação para  $\alpha$ -actina também foi alterada.

Devido à sensibilidade desta população linfocitária a tão variados estímulos, pode-se dizer que as células uNK são como sentinelas da interface materno-fetal, prontas para identificar as mais variadas alterações no

organismo materno e responder prontamente a estas.

Nos últimos anos estudos vem demonstrando que fatores externos ao ambiente uterino como estado emocional materno, poluição ambiental, consumo de álcool, drogas e alterações nutricionais tem forte relação com o desenvolvimento de doenças na vida adulta como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, depressão, ansiedade, etc. Ao mecanismo em que fatores externos influenciam o desenvolvimento da prole propiciando a manifestações de doenças na vida adulta, foi dado o nome de “programação fetal” e ao evento em que isto é observado foi dado o nome de “Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doenças” (DOHAD- *Developmental Origins of Health and Disease*).

Por meio da investigação dos componentes uterinos vem sendo comprovado que tais efeitos externos têm influência sobre a interface materno-fetal e que as células imunológicas presentes no útero podem ter um papel muito maior do que se havia previsto.

As citocinas liberadas pelas células imunes no útero gravídico medeiam um diálogo entre o embrião e os tecidos maternos e, assim, influenciam profundamente o desenvolvimento do feto. Por meio da interferência na expressão gênica e promoção de estresse celular, as citocinas liberadas provocam um impacto no desenvolvimento placentário e no crescimento fetal que, conseqüentemente, afetam o fenótipo metabólico e a saúde a longo prazo da prole.

Devido ao aumento exponencial de mulheres em idade reprodutiva com sobrepeso ou obesidade, bem como a influência que uma dieta hiperlipídica e o ganho de peso podem ter sobre o ambiente uterino e o desenvolvimento da prole, é trivial a investigação dos mecanismos relacionados a essas variáveis, mesmo que mecanismos básicos. É fundamental compreender, por exemplo, como elas se relacionam, como podemos interferir para evitar seus efeitos e até que ponto podem comprometer a qualidade de vida da mãe e suas futuras gerações.

Para entender melhor a resposta de células imunes do ambiente uterino ao excesso de lipídeo no organismo materno, parte deste trabalho foi desenvolvido na Universidade de Augusta, nos Estados Unidos, em colaboração com o Prof. Dr. Babak Baban.

Por meio de bolsa de Estágio no Exterior, concedida pela CAPES (processo: 88881.135944/2016-01), a discente Évila Salles passou 7 meses de seu doutorado no laboratório do Dr. Baban para investigar os efeitos do consumo de dieta HL por fêmeas Swiss (ICR) durante a gestação sobre as Células Linfoides Inatas uterina (uILC) por meio da técnica de citometria de fluxo.

As uILC são uma população de células imunes recém descritas e possuem grande importância para a fisiologia e manutenção da gestação. Essas células podem ser divididas em 3 diferentes subtipos: ILC1, ILC2 e ILC3. Cada subtipo de ILC está relacionado a um tipo de resposta do sistema imune e pouco se sabe sobre os mecanismos dessas células ao responder à insultos durante a gestação e não há trabalhos na literatura que relacionem a obesidade e dieta HL à atividade dessas células no útero.

Em seu tempo no laboratório do Dr. Baban, a senhorita Évila teve, não só a oportunidade de aprofundar seus conhecimentos a respeito da imunologia da gestação, mas também pôde colaborar com diversos outros trabalhos. Além dos resultados apresentados neste trabalho, a senhorita Évila já publicou um artigo de revisão em colaboração com o Dr. Baban a respeito do papel das ILCs na imunidade inata de neonatos (anexo b). Também auxiliou o Dr. Baban no desenvolvimento de projetos em relação a investigação de componentes imunes no leite materno e contribuiu em projetos nos quais Dr. Baban fazia parte, como o estudo do ciclo estral de fêmeas de camundongos com Dr. Krishnan Michael Dhandapani e Dr. Kumar Vaibhav, e a respeito dos mecanismos envolvendo células imunológicas uterinas e o desenvolvimento do espectro autista na prole em parceria com Dr. Ali Pillai (trabalhos ainda não publicados).

Durante seu doutorado a senhorita Salles, juntamente com seu orientador Dr. Valdemar Paffaro Junior, ainda escreveu 2 artigos científicos sendo um já submetido (anexo c) e publicou um artigo em colaboração com a Dr. Roseli Soncini (anexo d). Todos estes trabalhos relacionados à obesidade e/ou consumo de dieta hiperlipídica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Seguem os dados encontrados na literatura acerca de dieta hiperlipídica durante a gestação, programação fetal, células linfóides inatas e células Natural Killer uterinas.

### 2.1 DIETA HIPERLIPÍDICA E GESTAÇÃO

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO- *World Health Organization*) em 2016 cerca de 39% das mulheres e 39% dos homens, em todo o mundo, com idade acima de 18 anos encontravam-se com sobrepeso. No Brasil, neste mesmo ano, foi observado que 28% da população de crianças e jovens, com idade entre 5 a 19 anos, encontrava-se acima do peso. Já a porcentagem de mulheres obesas com idade acima de 18 anos era de cerca de 25,4% da população.

Diversas pesquisas têm relacionado a obesidade à baixa fertilidade ou à infertilidade de mulheres em idade reprodutiva. A literatura aponta que a obesidade está relacionada com casos de anovulação, oócitos de baixa qualidade, mau desenvolvimento de embriões, abortos, entre outros eventos ligados à infertilidade e falha gestacional (TALMOR et al, 2015; BUTLER, MCGUIRE; MANZARDO, 2015; BEST; BHATTACHARYA, 2015; SCHULTE; TSAI; MOLEY, 2015; MESSINIS et al, 2015; PASQUALI; PATTON; GAMBINERI, 2007).

Devido ao exposto acima, em especial o aumento do número de mulheres obesas em idade reprodutiva e obesidade materna em todo o mundo (WHO, 2016), diversos pesquisadores têm buscado investigar os efeitos da “overnutrition” (supernutrição) e seus potenciais prejuízos à gestação e à prole, mediante o consumo de dietas ricas em gordura por modelos animais (AFARADHI; OZANNE, 2011).

Estudos realizados, principalmente, com roedores demonstram que o consumo de dietas ricas em gordura, antes e durante a prenhez, promove alteração da expressão gênica em células endometriais e da placenta, bem como alterações morfológicas e nos vasos sanguíneos nas mesmas (LIANG et al., 2010; MAO et al., 2010; NITERT et al., 2013; QIAO et al., 2015; RHEE et al, 2016)

King e colaboradores (2013), por exemplo, demonstraram que o consumo de dieta indutora de obesidade (*Obesogenic Diet* – DIO) por fêmeas C57BL/6 pode aumentar a expressão de receptores de glicocorticoides e consequentemente de transportadores de aminoácidos na placenta, uma vez que o aumento na sinalização de glicocorticoides estaria relacionado à expressão dos transportadores de aminoácidos. Ainda em fêmeas C57BL/6 foi relatado, também, que o consumo de dieta hiperlipídica (HL ou *high-fat*- HF) pode promover estresse oxidativo e prejuízos ao sistema vascular da placenta (LIANG et al., 2010).

Outros trabalhos têm relacionado o consumo de dieta hiperlipídica e a alteração na expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória na placenta (ZHU; DU; FORD, 2010; KIM et al., 2014). Frias e colaboradores (2011) demonstraram que a dieta rica em gordura promove aumento da expressão de diversas citocinas pro-inflamatórias e de *Toll-like receptor 4* (TLR4) no ambiente uterino de fêmeas de macaco japoneses prenhes, independente das fêmeas estarem ou não obesas. Os mesmos autores observaram ainda que o consumo da dieta pôde promover redução de 38 a 56% do fluxo sanguíneo volumétrico na placenta e que esta modificação no fluxo sanguíneo era acompanhada de alterações morfológicas e isquemia, além de ter contribuído para o parto prematuro.

Resultados obtidos com o estudo de fêmeas de ratos Sprague–Dawley prenhes vão de encontro com os apresentados por Frias e colaboradores (2011) uma vez que foi relatado aumento na expressão de genes envolvidos com o crescimento placentário, suprimento sanguíneo, sinalização de citocinas e quimiocinas no final da gestação destes animais (NITERT et al., 2013).

Para Nitert e colaboradores (2013) o fato de dieta hiperlipídica causar alterações da expressão de genes envolvidos nas vias que modulam a angiogênese, circulação sanguínea, crescimento e desenvolvimento placentário e, principalmente, de genes envolvidos no metabolismo do ácido araquidônico e prostaglandinas (PG), como *Ptgs2* (fatty acid cyclo-oxidase; COX2) e *Pla2g2a* (phospholipase A2), sugere uma resposta placentária à alteração do metabolismo materno induzida pelo consumo da ração rica em gordura.

Quanto ao aumento na expressão de citocinas pro-inflamatórias, este

evento já havia sido descrito anteriormente em placentas humanas a termo, entretanto, não se sabia ao certo como este processo poderia ser induzido (CHARLLIER et al., 2008). Posteriormente, por meio de estudos utilizando modelos animais, foi proposto que este processo ocorra devido ao aumento de ácidos graxos livres, os quais ativariam os receptores TLR4 presentes em células do ambiente uterino prene promovendo assim, aumento na expressão destas citocinas (ZHU; DU; FORD, 2010).

Acredita-se que esta resposta da placenta à presença de ácidos graxos livres seja dependente do sexo do embrião em desenvolvimento, pois Tarrade e colaboradores (2013) demonstraram que o acúmulo de lipídeos na placenta de coelhos pode variar entre a placenta de fêmeas e machos em desenvolvimento. De acordo com estes pesquisadores, as placentas de embriões de fêmeas apresentaram maior acúmulo de ácidos graxos, enquanto os embriões machos tiveram maior quantidade de ácidos graxos e colesterol no plasma ao invés da placenta. Curiosamente, Mao e colaboradores (2010) haviam observado que a expressão de citocinas pro-inflamatórias é diferente na placenta de fêmeas camundongos quando comparada a placenta de machos, após o consumo de dieta rica em gordura pelas mães. As fêmeas apresentaram maior diferença quando comparadas ao grupo controle do que os machos.

Devido ao grande impacto na alteração da expressão de genes envolvidos nas mais variadas vias- *metabólica, fisiológica e imunológica*- no ambiente uterino, é esperado que o consumo de dieta hiperlipídica, bem como a obesidade, promovam alterações na morfologia do endométrio materno e na placenta durante a gestação.

Estudo desenvolvido em nosso laboratório, por exemplo, demonstrou que o consumo de dieta hiperlipídica por apenas 10 dias foi capaz de modificar células presentes no endométrio materno. As fêmeas eutanasiadas no 10º dia de gestação apresentaram redução na marcação para  $\alpha$ -actina nos vasos e células presentes na decídua e foi observado ainda, redução na reatividade das células uNK à lectina DBA e modificação da aparência de seus grânulos citoplasmáticos (SALLES, 2014).

Além de promover as alterações morfológicas relatadas por Salles (2014) a literatura descreve que o excesso de gordura no organismo materno

pode alterar até mesmo a invasividade das células trofoblásticas (HAYES et al., 2014). Foi demonstrado que ratas que consumiram dieta HL semanas antes de ficarem prenhas apresentaram invasão inicial de células trofoblásticas no endométrio 2 vezes maior quando comparada ao controle e uma explicação seria o aumento na expressão de metaloproteínase 9 (MMP 9). Apesar dessa maior invasividade, os autores relatam que a invasão de células trofoblásticas nas artérias espiraladas uterinas possa ter sido comprometida, já que nestas foi observado aumento na marcação para  $\alpha$ -actina, o que sugere falha na remodelação dessas artérias (HAYES et al., 2014).

Liang e colaboradores (2010), na busca de investigar as alterações decorrentes da diabetes durante a gestação, ofereceram dieta rica em gordura (41%) para fêmeas de camundongo por um mês antes da concepção e também durante a gestação. Os resultados mostraram que o consumo da dieta promoveu morte de células trofoblásticas e danos às células do endotélio na região de labirinto da placenta, o que comprometeu a gestação.

Além das complicações observadas na gestação decorrente da obesidade ou do alto consumo de gorduras e açúcares há também os efeitos na prole, a qual pode desenvolver as chamadas síndromes metabólicas (hipertensão, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares) na vida adulta (AVIRAM et al., 2011; ALFARADHI; OZANNE, 2011), através do mecanismo de programação fetal (BARKER et al, 1997; GODFREY; BARKER, 2000).

## 2.2 PROGRAMAÇÃO FETAL

O termo “Programação fetal” é utilizado para descrever a interferência que fatores externos podem exercer sobre o desenvolvimento da prole durante a gestação resultando em efeitos tardios (SCHLOTZ; PHILLIPS, 2009). Condições manifestadas durante períodos críticos do desenvolvimento podem levar a programação de alterações permanentes no sistema fisiológico e metabolismo (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Segundo a hipótese da “programação fetal”, alterações em períodos críticos do desenvolvimento fazem com que o feto tenha que se adaptar a essas condições, o que promove modificações permanentes no metabolismo e na fisiologia da prole (BARKER, 1997), levando assim, ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças

crônicas (SEKI, et al 2012) como doenças cardíacas (BARKER et al, 2007) e obesidade, bem como desordens metabólicas relacionadas à última (BREIER et al, 2001), entre outras alterações, até mesmo no comportamento da prole na vida adulta.

Segundo pesquisas, a programação fetal age através de modificações epigenéticas. Alterações na metilação e na adenilação de histonas e porções de DNA podem impedir ou induzir a expressão de genes que são, ou não, normalmente expressos (SEKI, et al 2012).

Em um estudo Suzuki e colaboradores (2012) analisaram o hábito de fumar e o relacionaram à programação fetal. Em seu estudo Suzuki e seus colegas, acompanharam mães que fumaram no início da gestação e constataram um maior ganho de peso dos filhos durante a infância, sendo este ganho foi mais acentuado em crianças do sexo masculino do que do sexo feminino, relatando, assim, um efeito de dimorfismo sexual relacionado aos efeitos de programação fetal. A relação entre programação fetal e dimorfismo sexual também foi descrita por NG e colaboradores (2010), os quais demonstraram que a submissão de machos à dieta hipercalórica gera disfunções das células  $\beta$ -pancreáticas de suas filhas na geração F1. Tais disfunções provocaram anormalidades metabólicas nestas fêmeas, como a diabetes.

Ponder e colaboradores (2011) demonstraram que distúrbios de humor da mãe, como a depressão e a ansiedade, durante a gestação, produzem efeitos de programação fetal/neonatal no neurodesenvolvimento da prole. Isso ocorre devido ao aumento da expressão do gene SLC6A4 (transportador de serotonina da placenta humana). Já Olivier e colaboradores (2011) demonstraram que administração de fluoxetina, droga comumente prescrita para o tratamento da depressão, em ratas prenhes, leva a resultados prejudiciais do comportamento da prole na vida adulta. A administração pré-natal de fluoxetina causa uma redução no tempo de interação social e aumenta o comportamento de ansiedade. Isso pode ocorrer devido a alterações no receptor de sinalização de 5-HT<sub>1A</sub> (receptor de serotonina).

Na programação fetal, a nutrição é um importante fator relacionado ao ambiente intrauterino que altera a expressão do genoma do feto, podendo trazer consequências para toda a vida. A alteração da nutrição pode provocar

modificações estruturais, fisiológicas e no metabolismo da prole (BREIER et al., 2001; WU et al, 2004).

Os estudos de programação fetal em humanos geralmente estão associados à nutrição. Um dos primeiros registros de programação fetal relacionado à nutrição, em humanos, foi a chamada *Dutch famine* (Fome de Dutch- cidade da Alemanha), a qual mulheres que estavam grávidas entre 1944 e 1945, II Guerra Mundial, passaram fome. Essas mães deram à luz a crianças de baixo peso, e foi observada que, entre essas crianças, a maioria dos homens se tornaram obesos ao atingirem idade entono de 19 anos (LEANDRO et al., 2009).

De acordo com a Food and Agriculture Organization (2003), atualmente cerca de 925 milhões de pessoas no mundo não consomem alimento em uma quantidade suficiente para serem consideradas saudáveis. Um estudo realizado na Índia revelou que mães subnutridas dão a luz a bebês magros, porém, com maior propensão a obesidade. Foi descoberto um distúrbio no metabolismo do carbono  $^{13}C$  dessas mulheres devido à subnutrição, este distúrbio acaba trazendo consequências para a síntese de ácido nucléico, estabilidade do genoma e a regulação de genes pela epigenética afetando o desenvolvimento do feto (YANJNIK; DESHMUKH, 2012).

Modelos animais como camundongos C57BL-6, Balb/c, Swiss, ratos Wistar, ovelhas, entre outros, têm sido utilizados na busca de um melhor entendimento acerca dos eventos nutrição/epigenética/programação fetal (SEKI et al., 2012). Estudos mostraram que a restrição do crescimento intrauterino (IURG- *intrauterin restriction growth*) causado, por exemplo, pela insuficiência de nutrientes durante a gestação, pode afetar o desenvolvimento do feto o qual irá tentar se adaptar às novas condições. Uma das consequências do IUGR seria a diminuição da expressão de genes relacionados à nefrogênese o que acaba elevando o risco de desenvolvimento da hipertensão na vida adulta (JONES et al, 2012).

Dados epidemiológicos apresentam uma relação significativa entre mães obesas, nutrição durante a gestação e prole obesa (ALFARADHI; OZANNE, 2011). Diversos estudos demonstram que a supernutrição (consumo exagerado de alimentos calóricos) durante a gestação retarda o crescimento da placenta, o crescimento fetal e aumenta a mortalidade fetal e neonatal em diversos

modelos animais (WU, 2004). Outros estudos demonstram que a obesidade na gestação aumenta o risco de hipertensão e diabetes, além das doenças cardiovasculares, na prole (AVIRAM et al., 2011).

Fan e colaboradores (2012) realizaram um estudo com primatas onde as fêmeas prenhes receberam ração de alta caloria (36% de caloria a mais) durante a gestação da prole. Os resultados da pesquisa de Fan e seus colegas revelaram que o consumo de uma dieta hipercalórica durante este período aumenta o risco de obesidade e de doenças cardiovascular relacionadas em fases tardias da vida da prole, independente da mãe estar ou não obesa durante a gestação.

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

## 2. 3 CÉLULAS LINFOIDES INATAS

As Células Linfóides Inatas ou ILCs (Innate Lymphoid Cells) representam uma população heterogênea de células do sistema imunológico inato. Essa classe de células imunológicas foi caracterizada recentemente, entretanto, alguns tipos celulares específicos, os quais foram incluídos a ela, veem sendo estudados por décadas, como é o caso das células *Natural Killer* (NK) (BANDO; COLONNA, 2016).

De acordo com a literatura as Células Linfóides Inatas podem ser divididas em três diferentes subtipos de acordo com suas funções, perfil de expressão de citocinas e fatores de transcrição, sendo que estes subtipos se espelham nos subtipos de células T helper CD4+, Th1, Th2 e Th17 (BANDO; COLONNA, 2016; SIMONI; NEWELL, 2017).

O grupo 1 de ILCs (ILC1) seria análogo ao grupo Th1 de células TCD4+

e produziria citocinas como Interferon gama (IFN $\gamma$ ), Fator de Necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e expressa T-bet e Eomesodermin (Eomes) como fatores de transcrição, além de caracterizado pela presença de CD127. É neste grupo, por exemplo, que se encontram inseridas as células *Natural Killer*, importantes na defesa contra células infectadas e tumorais. As células inseridas no grupo 2 de ILCs (ILC2) é caracterizado pela produção de citocinas semelhantes às apresentadas pelo grupo Th2, como interleucina 5 (IL-5) e IL-13 e apresenta grande expressão do fator de transcrição proteína de ligação GATA 3 (GATA 3). Já o grupo 3 de ILCs (ILC3) seria análogo ao grupo Th17 e produção citocinas semelhantes às produzidas por este grupo como IL-17, além de expressar o fator de transcrição ROR- $\gamma$ t. (SIMONI; NEWELL, 2017).

As ILC são normalmente localizadas nas mucosas e próximos a tecidos epiteliais, sendo importantes na proteção contra patógenos e na manutenção da homeostase do tecido (DIEFENBACH; COLONNA; KOYASU, 2014). A ativação dessas células pode ocorrer devido a sinais de estresse, presença de componentes microbianos e pelas citocinas diluídas no tecido, isso faz com que estas células sejam altamente reativas e sejam as primeiras efetoras da resposta imune (EBERL et al 2015). A ativação inapropriada das ILCs tem sido relacionada à patogênese de distúrbios inflamatórios e auto-imunes (DIEFENBACH; COLONNA; KOYASU, 2014).

Estudos recentes com humanos e camundongos mostraram a presença de Células Linfóides Inatas no útero durante a gestação, sendo estas denominadas ILC uterinas (uILC) (DOISNE et al., 2015). De acordo com a literatura as uILCs são importantes para o adequado remodelamento das artérias uterinas e desenvolvimento da placenta promovendo uma gestação normal e um adequado desenvolvimento do embrião (BOULENOUAR et al., 2016).

Doisne e colaboradores (2015) demonstraram que os três subtipos de ILCs também estão presentes no útero prenhe de camundongos e são encontrados em diferentes áreas dos sítios de implantação embrionária durante a gestação. Segundo o estudo apresentado, as uILC2s e uILC3s estão presentes na região do “Agregado Linfocitário Mesometrial da Prenhez” (MLAp) do sítio de implantação, enquanto o subtipo 1 de uILCs encontra-se distribuído por toda a Decídua Basal (DB) no útero prenhe.

Em humanos, um estudo recente mostrou que as ILC2s foram o subtipo de ILC mais abundante na interface materno-fetal humana durante as gestações pré-termo e a termo. Entretanto, o estudo mostrou que durante o trabalho de parto prematuro, houve aumento nos subtipos 2 e 3 de ILCs na decídua basal e decídua parietal, respectivamente. Tal resultado sugere que as ILCs podem desempenhar um papel na interface materno-fetal durante a processo de aborto espontâneo (XU et al., 2017).

Recentemente a literatura têm demonstrado que a função das ILCs vai além da proteção imunológica dos tecidos. As ILCs são muito importantes também fisiologicamente atuando, por exemplo, na regulação do metabolismo da gordura (QIU et al., 2014). Após expor camundongos a temperaturas de 4 a 5°C, Qiu e colaboradores (2014) verificaram que ILC2s podem auxiliar o remodelamento do tecido adiposo branco subcutâneo em gordura bege e regular a termogênese destas.

Já com relação a resposta imunológica no tecido adiposo, as ILCs do tipo 2 são importantes para promover a resposta imune evitando que haja uma resposta imunológica do tipo 3, caracterizada por desencadear síndromes metabólicas, resistência à insulina, diabetes e asma associada a obesidade (KIM et al., 2014).

Embora as ILCs tenham grande importância na atividade do sistema imunológico, no bom desenvolvimento da gestação e na fisiologia dos tecidos, incluindo o tecido adiposo, pouco se sabe acerca da atividade das ILCs em resposta a alterações durante a gestação, incluindo o excesso de gordura no organismo materno devido ao consumo de dieta hiperlipídica.

#### 2.4. CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS

O útero gestante contém grande quantidade de células imunológicas, as quais desempenham papéis muito importantes auxiliando os eventos de implantação, invasão trofoblástica, desenvolvimento da placenta e proteção imunológica. Porém, ao mesmo tempo em que dão suporte a tais eventos essas células devem apresentar uma resposta imune diferenciada, uma vez

que têm de ser tolerantes a presença do feto semi-alogênico em desenvolvimento.

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que entre as células imunes presentes no útero já no início da gestação de humanos cerca de 30-40% são leucócitos (BULMER et al., 1991). Dentre esta população leucocitária, as células Natural Killer uterinas (uNK) são o tipo celular mais abundante, representando cerca de 70% dos leucócitos decíduais (KOGA; MOR 2010; BULMER et al. 2010; LOKE; KING 2000) não só em humanos, mas também em outras espécies de mamíferos como primatas e roedores (PEEL, 1989; MOFFETT-KING, 2002).

Em humanos as células uNK são caracterizadas como células CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>, perfil semelhante ao apresentado por cerca de 10% da população de células NK circulantes (cNK), as quais são consideradas um subtipo regulatório de células NKc devido a sua maior expressão de citocinas (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004; VIVIER et al., 2008). Apesar da semelhança na expressão de CD56 e CD16 esses dois grupos celulares se diferenciam na expressão de alguns marcadores e na presença de grânulos citoplasmáticos, enquanto as células uNK apresentam grânulos muito evidentes em seu citoplasma, esses não observados em células cNK CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

Com relação a identificação das células uNK em camundongos, estas podem ser diferenciadas das células NK do sangue periférico pela expressão do açúcar N-acetil-D-Galactosamina nos grânulos e membrana plasmática, detectado pelo método de marcação histoquímico com lectina DBA (*Dolichos biflorus* agglutininina) (PAFFARO Jr et al., 2003). O uso da técnica de lectina DBA possibilitou a caracterização de quatro subtipos morfológicos de células uNK DBA reativos. O subtipo I de células uNK DBA<sup>+</sup> é considerado um subtipo imaturo com cerca de 9µm de diâmetro, pouca área citoplasmática e sem grânulos. O subtipo II é ligeiramente maior, apresenta cerca de 13µm de diâmetro com alguns grânulos em seu citoplasma. O subtipo III é considerado o subtipo mais diferenciado, com cerca de 26µm de diâmetro apresenta grande área de citoplasma onde se localizam vários grânulos. O IV e último subtipo é considerado o subtipo morfológicamente senescente de células uNK DBA reativo, é o maior subtipo apresentando cerca de 30µm de diâmetro, seu

citoplasma apresenta-se extraído, o conteúdo granular é variável, porém fortemente reativo à lectina DBA e sua membrana apresenta marcação descontínua para a mesma (PAFFARO et al., 2003).

Além da utilização da lectina DBA, em camundongos, essas células também podem ser diferenciadas por meio da marcação com ácido periódico de Schiff's (PAS), reagente histológico que marca glicoproteínas e especialmente mucinas. No entanto, a marcação com este reagente apresenta algumas limitações de análise (CROY et al., 2010a) principalmente pela degradação de RNA, o que já não ocorre no isolamento de células uNK utilizando-se a lectina DBA (CROY et al., 2010b).

A origem das células uNK na interface materno-fetal ainda é muito discutida na literatura. Durante a gestação de camundongos é possível observar que há um influxo de células uNK por volta do 5º dia de gestação, momento de implantação do blastocisto (KRUSE et al., 2002). As células ali presentes possuem morfologia de células indiferenciadas/imaturas com poucos grânulos citoplasmáticos, entretanto, com o decorrer da gestação, elas se multiplicam e se diferenciam em células maduras e apresentam grande quantidade de grânulos em seu citoplasma (PAFFARO Jr et al., 2003).

Chantakru e colaboradores (2001) sugerem que o acúmulo de células uNK no útero de camundongos ocorre devido ao recrutamento de células precursoras (pré-uNK) provenientes de órgãos linfóides como o baço. Corroborando com o que foi descrito por estes autores, Zavan e colaboradores (2012) demonstraram que fêmeas de camundongos esplenectomizadas antes da prenhez apresentaram atraso na chegada, maturação e senescência das células uNK, bem como atraso no desenvolvimento da decídua materna, da placenta, e do parto.

Em contrapartida, outros autores levantam ainda a possibilidade de que, em humanos, precursores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> presentes no útero possam se diferenciar em células uNK (KESKIN et al., 2007; MALE et al., 2010; VACCA et al., 2011). Em camundongos, a observação que células NK precursoras (NKP) imaturas NK1.1<sup>+</sup>DX5<sup>+</sup> poderiam migrar para o útero e sofrer diferenciação originando células uNK indica a existência de um mecanismo semelhante ao observado em humanos (CHIOSSONE et al., 2014).

O fato de não ter sido constatada a presença de células positivas para a

marcação com lectina DBA, tanto na superfície como em grânulos citoplasmáticos, em tecidos extrauterinos de camundongos virgens ou prenhes entre 0,5 a 7,5 dia de gestação indica que não existem fontes periféricas de células uNK maduras (BIANCO et al., 2008). Já com relação aos seus precursores, estudos demonstraram que estes são originados da medula óssea (PEEL et al., 1983; LYSIAK; LALA 1992) e estão presentes também no baço (MOORE et al., 1996; ZAVAN et al., 2012), o que pode ser corroborado pelo fato das células uNK expressarem CD9 assim como células NK da medula óssea e baço (Yadi et al., 2008). Yadi e colaboradores (2008) afirmam que as células uNK apresentam fenótipo semelhante aos seus precursores extrauterinos pela expressão de CD3<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup> e que, uma vez no útero essas células passam a expressar receptores da família Ly49.

Outra importante observação para explicar a origem das células uNK seria o fato de o fenômeno da gestação promover a diminuição de linfócitos em órgãos linfoides primários (MEDINA; KINCADE 1994; CLARKE; KENDALL 1994; TIBBETTS et al. 1999) e levar a hipertrofia de órgãos linfoides secundários como linfonodo e baço (SASAKI; ITO, 1980; ANSELL et al., 1978; HETHERINGTON; HUMBER, 1977). A mobilização linfocitária observada durante a gestação, associada à estudos que demonstram a presença de células uNK em sítios de desenvolvimento embrionário de camundongos deficientes em NK (TgE-26) após transplante de linfócitos provenientes do baço de camundongos normais (CHANTAKRU et al., 2002), nos leva a crer que o grande aumento dessas células observado no início da gestação se deve, principalmente, à precursores oriundos de tecidos extrauterinos.

Uma análise da literatura, portanto, indica que atualmente existem cerca de três mecanismos propostos para explicar a origem das células uNK na interface materno-fetal, sendo o primeiro o recrutamento de células NK CD56<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> do sangue periférico que, uma vez no útero, se diferenciam em células uNK (CARLINO et al., 2008; KESKIN et al., 2007). O fato de células decíduais e trofoblásticas serem capaz de produzir e liberar fatores quimiotáticos de células NK vai de encontro com o que está proposto neste mecanismo (CARLINO et al., 2008). O segundo mecanismo propõe que células NK endometriais (eNK) se diferenciam em resposta a fatores associados a gestação na interface materno-fetal, como progesterona e outros hormônios e

interleucinas, como interleucina-15 (IL-15) (MANASTER et al., 2008). O terceiro mecanismo proposto pela literatura sugere que as células uNK se diferenciariam de precursores hematopoiético presentes na decídua em resposta a fatores do estroma decidual (CARLINO et al., 2008; VACCA et al., 2011). Não se pode descartar também a hipótese de que estes três mecanismos estariam ocorrendo em paralelo (FAAS; DE VOUS, 2017).

Além desses mecanismos propostos, recentemente Sojka e colaboradores (2018) sugeriram a ocorrência de duas ondas de acúmulo de células NK no sítio de implantação de camundongos. De acordo com esses autores a primeira onda ocorreria devido a diferenciação de células NK residentes do tecido durante o processo de decidualização – no início da gestação. A segunda onde ocorreria a partir da migração de células NK provenientes da circulação sanguínea para os sítios de implantação por volta do 11º dia de gestação.

Os resultados quanto a origem das células uNK mostram que ainda são necessários mais estudos para determinar como se dá o acúmulo destas células na interface materno-fetal. O estudo fenotípico das células uNK em humanos e roedores, por exemplo, mostrou que em ambas as espécies essas células podem ser divididas em subpopulações, o que poderia ser um dos motivos para sua origem inconclusiva.

Estudos em humanos revelaram a existência de duas subpopulações distintas destas células, as células Natural Killer endometriais (eNK) (PACE et al. 1989; MANASTER; MANDELBOIM 2008) e células Natural Killer deciduais (dNK) (HO et al. 1996; HANNA et al. 2006; MANASTER; MANDELBOIM 2010). As células eNK são células que estão presentes no endométrio uterino não gravídico, enquanto as dNK seriam aquelas que migram para o útero apenas no momento da gestação (MANASTER e MANDELBOIM 2010), além disso, essas duas populações se diferenciam na expressão de moléculas como CD16, que está presente em dNK e ausente em eNK (HO et al. 1996; MANASTER; MANDELBOIM, 2010; HIBY et al., 2008; ERIKSSON et al., 2004).

Assim como em humanos, em camundongos também é notada a existência de subpopulações distintas de células uNK. Zhang e colaboradores (2011) demonstraram a existência de uNK PAS<sup>+</sup>DBA<sup>+</sup>, que parecem ter precursores circulantes, e uNK PAS<sup>+</sup>DBA<sup>-</sup>, com precursores intrauterinos. Ainda

segundo estes autores, além da diferença na marcação para lectina DBA estas duas populações se diferenciam com a produção de citocinas e fatores angiogênicos, o que sugere ações diferenciadas no ambiente uterino. No entanto, Lima e colaboradores (2012) demonstraram a capacidade multifuncional das uNK uma vez que dentro da subpopulação de células PAS<sup>+</sup>DBA<sup>+</sup> existem células com capacidade citotóxica e também com capacidade de secretar fatores angiogênicos.

Resultados semelhantes obtidos por Chen e colaboradores (2012) reforçaram a existência de expressão gênica diferencial entre células uNK DBA<sup>-</sup> e DBA<sup>+</sup>. Segundo estes autores as células DBA<sup>-</sup> teriam grande potencial de produção de IFN- $\gamma$ , enquanto as células DBA<sup>+</sup> possuem maior potencial de produção de interleucina-22 e fatores angiogênicos, além disso, reforçam a existência de funcionalidade diferencial entre células uNK DBA<sup>+</sup>, sendo que algumas dessas células expressam Vegfa (vascular endothelial growth factor A) enquanto outras não.

Apesar das discussões quanto a origem das células uNK, sabe-se que o aumento do número destas células útero com o progresso da gestação pode ocorrer devido proliferação de células uNK imaturas, uma vez que estas células expressam antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (PAFFARO Jr et al., 2003). Além disso, outros estudos indicam a presença de fatores mitóticos (WANG et al., 2003) sugerindo que parte do aumento observado no número de células é resultado de proliferação.

De acordo com a literatura a Interleucina-15 (IL-15) seria a grande responsável pela proliferação (KITAYA et al., 2000) e diferenciação celular das uNK (PUZANOV et al., 1996), uma vez que a presença de células uNK no útero coincidem com níveis elevados desta interleucina no endométrio de humanos (KING, 2000) e camundongos (YE et al., 1996). Além disso, a progesterona seria a grande responsável por induzir a expressão e liberação de IL-15 por células decíduais (ACAR et al., 2011), uma vez que a quantidade de células uNK no útero varia de acordo com os níveis desse hormônio.

A mesma relação pode ser observada em humanos não só durante a gestação, mas também na fase secretora do ciclo menstrual, na qual a progesterona está alta e é possível detectar aumento na expressão de IL-15 (OKADA et al., 2000), momento em que também são observadas células uNK,

as quais não possuem receptores para progesterona (KING et al., 1996).

Estudo com animais *Knockout* para IL-15 demonstraram que a ausência desta interleucina leva a falha do processo de remodelamento das artérias espiraladas do útero, uma vez que esses animais não possuem células uNK nos sítios de implantação (ASHKAR et al., 2003).

Em camundongos as células uNK alcançam seu maior número na decídua materna no período mediano da gestação, entre o 9° e 12°ddg (ASHKAR; CROY, 1999). Após este dia a quantidade de células uNK diminui progressivamente e, concomitante a redução das células uNK é observada, também, redução nos níveis de IL-15 (YE et al., 1996). Esta mesma dinâmica na variação da quantidade das células uNK é observada em ratos e humanos (ZHANG et al., 2011). Assim sendo, a IL-15 pode ser indicada como a citocina, produzida pelas células estromais, imprescindível para o estabelecimento e diferenciação das células uNK (VAN DEN HEUVEL et al., 2005).

Ao final da gestação de camundongos, próximo ao parto (dias de gestação: 19-20) as células uNK se encontram numericamente reduzidas ou ausentes (CHEN et al., 2012; DELGADO et al., 1996). Alguns estudos apontam que o declínio das células uNK no período gestacional final se deve tanto à processos de apoptose como também de necrose (PEEL, 1989; KUSAKABE et al., 1999), no entanto os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos.

Estudo realizado por Zavan e colaboradores (2010) sugere que a fibronectina tenha um papel importante na manutenção da viabilidade e indução da senescência das células uNK na decídua. Segundo estes autores, a maioria das células senescentes podem ser observadas no período gestacional em que a matriz extracelular apresenta redução na quantidade de fibronectina devido ao processo de decidualização, o que sugere que o contato das células uNK com a fibronectina da matriz seja importante para a manutenção da viabilidade destas células.

A proximidade das células uNK ao trofoblasto extraviloso na interface materno-fetal, no momento da implantação, sugere que as uNK possam reconhecer as células trofoblásticas como sendo oriundas do feto e regular sua invasão (LOKE; KING, 1995) sem apresentar atividade citotóxica contra elas (KING et al., 2000). As uNK possuem grânulos citoplasmáticos bastante evidentes, os quais armazenam enzimas, como a perforina, indicando um

potencial citolítico. Kopcow e colaboradores (2005) demonstraram que, apesar das células uNK apresentarem esse potencial, elas também mostram uma redução da sua capacidade citotóxica pela ausência de expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I.

A invasão do trofoblasto extraviloso na decídua e artérias espiraladas é essencial para o estabelecimento do suporte sanguíneo materno ao feto. Tal processo deve ser cuidadosamente controlado, uma vez que uma invasão exacerbada ou reduzida pode causar consequências indesejadas para a gestação, como por exemplo: pré-eclampsia, déficit de crescimento intrauterino, parto prematuro, aborto e até mesmo complicações como placenta acreta (PIJNENBORG et al., 1983).

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

Outro evento crucial para o sucesso gestacional é o remodelamento adequado das artérias espiraladas mesometriais durante o processo de placentação. Este processo é importante tanto em humanos quanto em camundongos, embora cada qual tenha suas particularidades. Em humanos as células uNK seriam responsáveis por promover um afrouxamento das artérias (ROBSON et al., 2012). Após a implantação, as células do trofoblasto extraviloso destroem a musculatura lisa das artérias e há a substituição das células endoteliais por células trofoblásticas endovasculares (KAM et al., 1999; PIJNENBORG; VERCRUYSSSE; HANSENS, 2006). Já em camundongos, há uma menor migração de células trofoblásticas endovasculares e a modificação das artérias é resultado, principalmente, da infiltração de células uNK (TILBURGS et al., 2009).

Tal processo é influenciado por moléculas vasoativas como o VEGF,

angiotensina I/II, Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e óxido nítrico (NO), todas elas são produzidas pelas células uNK (ZHANG et al., 2011; BLOIS et al., 2010; LIMA et al., 2012; ASHKAR et al., 2003; LEONARD et al., 2006; HATTA et al., 2011).

Dentre as moléculas sinalizadoras produzidas pelas células uNK o IFN- $\gamma$  tem se mostrado de grande importância para a modificação das artérias uterinas. Estudos realizados por Ashkar e Croy (1999) mensuraram a concentração de IFN- $\gamma$  em homogenizados da região mesometrial de sítios de implantação embrionárias e identificaram o aumento significativo dessa citocina pro-inflamatória no início da gestação (entre 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dgd), período este que coincide com o aumento em número das células uNK. O pico de concentração de IFN- $\gamma$  ocorre de maneira concomitante ao pico do número de células uNK (10<sup>o</sup> dgd). Após esse período, tanto a concentração de IFN- $\gamma$  quanto a quantidade de uNK decaem até o final da gestação. A produção de IFN- $\gamma$  pelas células uNK parece ocorrer por estímulo de citocinas pró-inflamatória como IL-12, IL-15 e IL-18 (YU et al., 2006). Segundo esses mesmos autores, nos sítios de implantação de camundongos *Knockout* para IFN- $\gamma$  ou para receptores dessa citocina (IFN- $\gamma$ R1), eram encontradas muitas uNK, no entanto, estas possuíam tamanho reduzido (indiferenciadas), e a modificação das artérias espiraladas não pode ser constatada.

Além do INF- $\gamma$ , as uNK de camundongos também secretam fator estimulador de colônias-1 (CSF-1) que contribui para a diferenciação de macrófagos no útero (POLLARD et al., 1991), IL-1, fator inibitório de leucemia (LIF) (CROY et al., 1991), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e VEGF (LASH et al., 2006; LASH et al., 2011).

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

Análises morfológicas no útero de camundongos diabéticos (NOD) revelaram que a ocorrência de hiperglicemia antes do acasalamento limita a

modificação das artérias espiraladas devido a uma redução no número de células uNK na decídua (SEAWARD et al., 2010). Ainda segundo Seaward e colaboradores (2010), em camundongos NOD nocautes em IFN $\gamma$  (d-NOD.*IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup>) há uma má formação da decídua basal e do agregado mesometrial linfocitário da prenhez (MLAp), este apresenta tamanho semelhante ao da placenta e possui células uNK grandes e hipogranulares, resultando em anormalidades morfológicas dos sítios de implantação

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

Dessa forma, a função principal das células uNK em camundongos parecer contribuir para o desenvolvimento normal da placenta e decídua (CROY; KISO, 1993; GUIMOND et al., 1997; ASHKAR et al., 2000; CROY et al., 2003a; CROY et al., 2003b). Estudos utilizando camundongos prenhes transgênicos tge26 (NK<sup>-</sup> T<sup>-</sup> B<sup>+</sup>), e também não apresentam células uNK, demonstraram alta taxa de perda gestacional e os fetos que sobreviviam apresentavam placenta reduzida e remodelamento incompleto das artérias espiraladas do útero (GUIMOND et al., 1998). As células uNK de humanos podem exercer papel semelhante às de camundongos, visto que as uNK de humanos também produzem moléculas angiogênicas (LANGER et al., 1999; LI et al., 2001; CROY et al., 2003b).

Atualmente a importância do sistema imune no ambiente uterino durante a gestação é indiscutível. As células ali presentes são de grande importância na preparação do endométrio para a implantação do blastocisto, na manutenção da gestação e inclusive durante o parto, além de promover proteção contra infecções.

Como apresentado, as Células Linfoides Inatas uterinas, bem como as células *Natural Killer* uterinas, são células de grande importância durante a gestação. O entendimento dessas células peculiaridades se faz necessário

para elucidar os processos gestacionais em que elas estão envolvidas, tanto em uma gestação normal como em quadros clínicos como obesidade, pré-eclampsia, diabetes gestacional, entre outros. Apesar de muitos estudos relacionarem a obesidade e a má nutrição durante a gestação com efeitos prejudiciais ao desenvolvimento da prole não existem trabalhos que tenham investigado os efeitos de uma dieta hiperlipídica sobre as uILC e uNK na geração F1 (prole) prenhe.

Sendo assim, este trabalho prospectivo e inédito, buscou estudar os efeitos da dieta hiperlipídica, indutora de obesidade, sobre as populações de células uILC e uNK em fêmeas de camundongos prenhes, bem como o efeito do consumo da dieta HL sobre a população de células uNK da geração F1 prenhe. Como demonstrado a seguir, os resultados aqui gerados são de grande importância para a compreensão da resposta do sistema imune à dieta HL e ao evento de programação fetal.

### **3 OBJETIVOS**

Segue abaixo os objetivos geral e específicos do trabalho.

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica na geração parental prenhe e nas fêmeas da geração F1, também prenhes, por meio de estudo morfológico, citoquímico, estereológico e molecular no 6°, 10° e 14° dias de gestação.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Segue abaixo os objetivos específicos do presente trabalho:

- a) avaliar o ganho de peso de fêmeas submetidas à dieta hiperlipídica (HL) durante a gestação;
- b) analisar a expressão de N-Acetil-D-Galactosamina nas células uNK por meio da citoquímica de lectina DBA no útero de mães HL no 6°, 10° e 14° dias de gestação;

- c) averiguar a morfologia uterina e das células uNK;
- d) quantificar a incidência e distribuição dos 4 subtipos de células *uNK* DBA reativos;
- e) avaliar o perfil de expressão citocinas pro-inflamatórias na interface-materno fetal de mães HL também no 6°, 10° e 14° dias de gestação;
- f) quantificar a expressão de *Toll-like receptor-4* (TLR4), perforina, granzima B, Ly49A e Ly49B, relacionados à citotoxicidade das células uNK;
- g) averiguar a presença de células positivas para caspase-3 clivada no sítio de implantação de mães no 10°ddg;
- h) avaliar a população de ILCs no útero de camundongos submetidos à dieta HL no 6°, 10° e 14° dias de gestação por meio da citometria de fluxo;
- i) avaliar o número, peso e tamanho dos filhotes nascidos de mães que consumiram a dieta hiperlipídica durante toda a gestação;
- j) avaliar o ganho de peso da geração F1 do 2° ao 60° dia pós-natal e do 1° ao 14° dia de gestação;
- k) averiguar a morfologia uterina e das células uNK da F1 no 10° dia de gestação;
- l) quantificar a incidência e distribuição dos 4 subtipos de células *uNK* DBA<sup>+</sup> também no 10° dia de gestação na geração F1;
- m) quantificar a expressão de perforina e averiguar a presença de células positivas para caspase-3 clivada no 10°ddg da geração F1.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir seguem os materiais utilizados e os procedimentos realizados no desenvolvimento do trabalho.

### 4.1 ANIMAIS

#### 4.1.1 Universidade Federal de Alfenas - Brasil

Foram utilizados 110 camundongos fêmeas e 40 machos da linhagem Swiss, dos quais 90 (n=5/grupo) fêmeas e 30 machos foram adquiridos no Biotério da UNIFAL-MG para análises das mães e 20 fêmeas e 10 machos para a obtenção das proles da geração F1.

Todos os procedimentos para a realização deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG (protocolo número 656/2014).

#### 4.1.2 Universidade de Augusta- Estados Unidos

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo “Institutional Animal Care and Use Committee” da Universidade de Augusta, Augusta, GA, EUA. Foram utilizadas 30 fêmeas (cerca de 5 fêmeas/grupo) e 10 machos de camundongos suíços (*Swiss/ICR*), os quais foram obtidos no Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EUA.

As fêmeas foram acasaladas com os machos e o dia em cuja manhã foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado como sendo o 1º dia de gestação (ddg). As fêmeas prenhes foram submetidas a ração Hiperlipídica e acesso à água *ad libitum* ou ração normal, também com acesso *ad libitum* à água, os animais foram mantidos em ciclo de 12/12 horas claro e escuro no Biotério da Escola de Odontologia da Universidade de Augusta.

## 4.2 DIETAS

A ração Hiperlipídica (HL) contendo 60% de gordura de origem animal (banha de porco) e de óleo de soja e a ração controle (RC) foram adquiridas comercialmente das empresas Prag Soluções- biociências © (Brasil) e Bio-Serv (EUA).

Tabela 1- Proporção nutricional das rações

Componentes	RC Prag Soluções- biociências ©	HL Prag Soluções- biociências ©	RC Bio-Serv ®	HF Bio-Serv ®
Matéria mineral	8,0%	5,0%	3,5%	3,5%
Proteína bruta	22,0%	26,0%	20,5%	20,5%
Extrato etéreo (gordura)	4,0%	34,0%	7,2%	36,0%
Fibra bruta	6,0%	8,0%	0,0%	0,0%
Carboidratos	60,0%	26,5%	61,6%	35,7%

Fonte: Do autor

Nota: Tabela mostrando a proporção dos componentes nutricionais em % das dietas hiperlipídicas utilizados neste estudo. Prag Soluções- biociências ©: RC: 3640 cal/Kg; HF: 5254 cal/Kg. Bio-Serv ®: RC: 3930 cal/Kg; HF: 5490 cal/Kg. RC- ração controle; HL- ração hiperlipídica.

## 4.3 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

### 4.3.1 Obtenção das mães Hiperlipídicas e Controle

Para obtenção das mães prenhes 90 fêmeas foram colocadas para acasalar com 30 machos e na manhã em que foi detectado o tampão vaginal estas foram consideradas como estando no 1º dia de gestação (ddg). As prenhes eram então separadas em 6 grupos, sendo 3 grupos de ração controle (MRC) e 3 grupos de ração hiperlipídica (MHL) (TABELA 2). Os animais receberam as rações adequadas a cada grupo até o momento da eutanásia no 6º, 10º ou 14º dia de gestação e tiveram acesso à água *ad libitum*.

Tabela 2- Distribuição do número de animais provenientes do Biotério Central, utilizados para estudo das mães e obtenção da prole.

Grupo	Análises de ganho de peso, morfológicas e das células uNK	Análise da expressão gênica	Análises por citometria de fluxo (EUA)
MRC 6°ddg	5	5	5
MHL 6°dgg	5	5	5
MRC 10°ddg	5	5	5
MHL 10°dgg	5	5	5
MRC 14°ddg	5	5	5
MHL 14°dgg	5	5	5
<b>Total de mães</b>		<b>90</b>	

Fonte: Do autor

Nota: A tabela mostra as análises que foram realizadas e o número de animais utilizados por grupo experimental para a execução das mesmas. MRC- mães ração controle; MHL- mães ração hiperlipídica; ddg- dia de gestação.

#### 4.3.2 Obtenção da prole Hiperlipídica e Controle

Para obtenção da prole de camundongos tratados com ração hiperlipídica e controles durante a gestação 24 camundongos fêmeas foram acasaladas com 10 machos e, após a confirmação da prenhez, as fêmeas foram submetidas à ração hiperlipídica ou controle do 1° ddg até a prenhez a termo, momento em que a ração hiperlipídica era removida.

No segundo dia pós-natal (DPN) o peso e o tamanho dos filhotes foram analisados. Ainda no 2°DPN a prole foi padronizada em 8 filhotes (4 fêmeas e 4 machos) ou 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas) por mãe e foi realizado o procedimento de fostering, que consiste na adoção de ninhadas por outras fêmeas. Este procedimento visou eliminar os efeitos que o leite de mães HL poderia vir a ter na formação de seus filhotes, sendo assim, as proles de mães normais (F1RC) foram adotadas por outras mães também normais (MRC), e as proles de mães HL (F1HL) foram adotadas por mães que consumiram somente ração normal (MRC). O peso e o tamanho das fêmeas de cada ninhada foram analisados de dois em dois dias do 2° ao 60°PND.

Após o desmame a prole recebeu apenas ração controle, quando atingiu a maturidade sexual as fêmeas foram acasaladas com machos, não parentais, e após confirmação da prenhez foram analisadas 10º ddg, como mostra a tabela dos grupos experimentais (Tabela 3). Ressalta-se que, para cada análise a ser realizada, foram utilizadas no máximo 2 fêmeas provenientes de uma mesma prole, garantindo-se assim a variabilidade dos dados.

Tabela 3- Distribuição do número de animais das fêmeas da geração F1 para cada análise experimental.

Grupo	Análises de ganho de peso, morfológicas e das células uNK	Análises de ganho de peso e da expressão gênica
F1RC 10ºddg	5	5
F1HL 10ºdgg	5	5
<b>Total de F1 prenhe</b>		<b>20</b>

Fonte: Do autor

Nota: A tabela mostra as análises que foram realizadas e o número de animais utilizados por grupo experimental para a execução das mesmas. F1RC- F1 filhas de mães controle; F1HL- filhas de mães hiperlipídicas; ddg- dia de gestação.

#### 4.4 ANÁLISE DO GANHO DE PESO DAS FÊMEAS PRENHES

Para a análise do ganho de peso das mães durante a gestação o peso das fêmeas prenhes foi analisado no 1º, 2º, 4º, 6º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º e 18ºddg. Já para averiguar o ganho de peso das fêmeas F1 prenhes, este foi medido no 1º e 10ºddg e foi realizado o delta do ganho de peso.

#### 4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO E DA VIABILIDADE GESTACIONAL

Para a análise da viabilidade gestacional, após a eutanásia dos animais, os sítios de implantação eram contados e analisados macroscopicamente. Foram observados parâmetros macroscópicos como presença ou não de sítios de implantação, presença de sítios hemorrágicos e sítios em reabsorção. Para análise estatística foi realizada a média do número de sítios por fêmea em cada dia de gestação.

## 4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Imediatamente após o animal ter sido morto por overdose de anestésico inalatório (Isoflurano) foi realizada a laparotomia da região ventral do animal e perfusão com fixador e, em seguida, foram coletados o tecido adiposo perigonadal e os sítios de implantação, os quais foram encaminhados para processamento histológico.

### 4.6.1 Processamento para embebição em parafina

Os animais foram perfundidos com cerca de 20ml de paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,05M pH7,4, e foram coletados o tecido adiposo perigonadal e os sítios de implantação embrionária. Os tecidos foram desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol para embebição em parafina (Paraplast, Sigma Chemical Co. USA). Foram obtidos cortes histológicos dos blocos de parafina com espessura de 7 $\mu$ m os quais foram montados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina a 10%. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação morfológica e os sítios de implantação foram também submetidos à histoquímica de lectina DBA, imunofluorescência para perforina e para caspase-3 clivada.

### 4.6.2 Quantificação da adiposidade abdominal

A análise morfométrica do tecido adiposo branco perigonadal foi realizada utilizando-se microscópio fotônico (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sight-Fi1/Nikon/Japan). A área dos adipócitos foi medida com auxílio do programa NIS-Elements (Nikon/Japan), onde foram fotografados cinco campos aleatórios, de um corte de tecido adiposo com 7 $\mu$ m de espessura, de cada animal, no aumento de 20x. Em cada campo fotografado, foram medidos 10 adipócitos aleatoriamente e coletados os valores das suas áreas em micrômetros quadrados ( $\mu$ m<sup>2</sup>) (CONCEIÇÃO et al., 2011).

#### 4.6.3 Citoquímica com lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*)

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

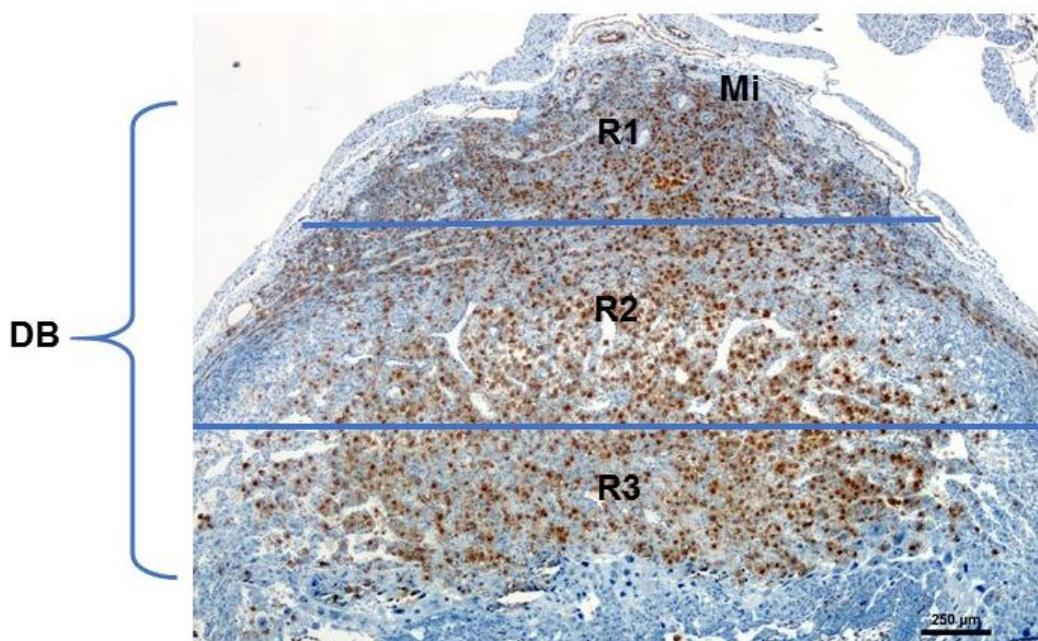
- a) Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4 por 3 vezes;
- b) Incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vols.) 1% em PBS 0,05M durante 30 minutos;
- c) Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- d) Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- e) Incubação com lectina DBA (*Dolichos biflorus*) biotinada (Sigma Chemical Co. USA) diluída na proporção de 1:300 em PBS/BSA 1% pH 6,8, overnight, a 4° C;
- f) Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 3 vezes;
- g) Incubação com o complexo streptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co. – USA) em PBS 0.05M na proporção de 1:300 por 1 hora;
- h) Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes;
- i) Incubação DAB (3-3 Diaminobenzidina) (Sigma Chemical Co. – USA) (250µL) + PBS 0,05M pH 7,4 (2250 µL) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 vols. (20 µL).
- j) Lavagem com água destilada;
- k) Contra-coloração com Hematoxilina durante 30 segundos;
- l) Os cortes foram então desidratados em gradientes crescentes de etanol e diafanizados em xilol, e montados em meio permanente para observação ao microscópio fotônico (Nikon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado pela adição do glicoconjugado contendo N-Acetil-Galactosamina após a incubação com a Lectina DBA.

#### 4.6.4 Estudo Estereológico em Microscopia Fotônica

Foram analisados, de forma aleatória, 3 cortes histológicos de 3 sítios de implantação embrionária distintos submetidos à citoquímica de lectina DBA, procedentes de 5 animais de cada grupo experimental (mães e F1) para análise estereológica. Neste estudo quantitativo, foi obtida a densidade dos perfis (QA) em uma área teste (AT)  $200\mu\text{m}^2$ , dos 4 subtipos distintos de uNK localizados em 3 regiões do útero prenhe de camundongos modificado a partir dos experimentos de Paffaro Jr et al., (2003) (Figura 1). A delimitação destas 3 regiões obedeceu às variações decorrentes do crescimento uterino de acordo com o dia de gestação. A área teste foi delimitada através de um sistema de teste quadrático o qual possui duas linhas de exclusão e assim, foram contadas apenas as células que exibirem o núcleo localizado na área teste nos cortes observados, exceto aquelas que tocarem as duas linhas de exclusão do sistema teste.

Figura 1- Divisão das 3 regiões de análise das células uNK



Fonte: Adaptado de Paffaro et al., 2003

Nota: Esquema mostrando a divisão dos sítios de implantação. DB- decídua basal; Mi- miométrio; R1- região 1; R2- região 2; R3- região 3.

#### 4.6.5 Imunofluorescência para Perforina e marcação com lectina DBA

Após o processo de desparafinizados em xilol e hidratação em gradiente decrescente de etanol e água destilada, os cortes foram submetidos à reação de imunofluorescência da seguinte maneira:

- a) Recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1M pH6,0;
- b) Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4;
- c) Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- d) Incubação com anti-corpo primário, anti-perforina feito em coelho (Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA.), na proporção de 1:50, e com lectina DBA-FITC (1:300) em PBS/BSA 1% pH 7,4, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- e) Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- f) Incubação com anti-corpo secundário, *anti-habbit* Texas Red, feito em cabra (Sigma Chemical Co. USA), diluído na proporção de 1:250 em PBS/BSA 1% pH 7,4, por 1 hora em temperatura ambiente;
- g) Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- h) Incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 1:1000 por 5 minutos
- i) Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 5 vezes;
- j) As lâminas foram montadas com solução de glicerol 10%, foram cobertas com lamínulas e vedadas com esmalte.

Foi realizada a observação ao microscópio de fluorescência (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmara digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti-perforina no item 5.6.5d.

#### 4.6.6 Imunofluorescência para Caspase 3-clivada e marcação com lectina DBA

Após o processo de desparafinizados em xilol e hidratação em gradiente decrescente de etanol e água destilada, os cortes foram submetidos à reação de imunofluorescência da seguinte maneira:

- a) Lavagem dos cortes com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M pH 7.4;
- b) Incubação com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos;
- c) Incubação com anti-corpo primário, anti-caspase-3 clivada feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology.), diluído na proporção de 1:50, e com lectina DBA-Rodamina (1:150) em PBS/BSA 1% pH 7,4, overnight, a 4° C em câmara úmida;
- d) Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- e) Incubação com anti-corpo secundário, *anti-habbit*-FITC, feito em cabra (Sigma Chemical Co. USA), na proporção de 1:100 em PBS/BSA 1% pH 7,4, por 1 hora em temperatura ambiente;
- f) Lavagem com PBS 0,05 M pH 7,4 por 5 vezes;
- g) Incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 1:1000 por 5 minutos
- h) Lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 5 vezes;
- i) As lâminas foram montadas com solução de glicerol 10%, cobertas com lamínulas e vedadas com esmalte.
- j) Foi realizada a observação ao microscópio de fluorescência (Níkon Eclipse 80i/Japan) com câmera digital acoplada (Digital Sigth-Fi1/Nikon/Japan) e software de análise de imagens (NIS-Elements/Nikon/Japan).

O controle negativo foi realizado pela subtração do anticorpo primário anti-caspase-3 clivada no item 5.6.6d.

## 4.7 ESTUDO MOLECULAR

As fêmeas prenhes nos diferentes dias de gestação foram sacrificadas por deslocamento cervical e os úteros contendo os sítios de implantação embrionária (SI) no 6°, 10° e 14° ddg foram coletados e mantidos em banho de gelo durante a manipulação. Os sítios foram individualizados e dividiu-se a porção mesometrial da anti-mesometrial, a qual foi descartada. A camada muscular que envolvia a porção mesometrial foi removida e a decídua coletada (CROY et al., 2014) e macerada para a obtenção de uma suspensão celular única. Foram coletados 30mg de tecido por animal.

### 4.7.1 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total foi utilizado SV Total RNA Isolation Promega® (REF Z3100) e os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc) em 260 nm e 280 nm.

### 4.7.2 Obtenção do cDNA

A partir do RNA total obtido a síntese de cDNA foi realizado utilizando o Superscript III First-strand cDNA Kit (ThermoFisher Scientific) e de acordo com o seguinte protocolo:

O RNA foi diluído em água DEPEC (1000 µg de RNA em 12,5 µL), a esta solução foi adicionado 1ul de dNTP (10mM) e 1 ul de Random Hexamer e incubado a 65°C por 5 min. e 4°C por 2 min. Em seguida foram adicionados 4ul de tampão 5x, 1 ul de DTT 0,1M e 0,5ul de de enzima SuperScript III, as amostras foram então incubadas a 25°C por 5 min., 50°C por 60 min. e 70°C por 15 min em termociclador e em seguida mantida a 4°C.

### 4.7.3 qRT-PCR

Para amplificação do cDNA foi realizado o RT-PCR em Tempo Real utilizando-se Kit SYBR® Green (Applied Biosystem), no sistema *7500 Real*

*Time PCR* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, e *primers* específicos com as seqüências sense e anti-sense, adotando a GAPDH como controle endógeno. Para a quantificação da expressão relativa foi utilizada a fórmula de PFAFFL (PFAFFL, 2001). Os primers utilizados para as análises estão presentes na tabela 4.

Tabela 4- Primers utilizados para as análises molecular

Genes	Sequências	Quantidade de pares de base	Temperatura de anelamento
TLR4	F: GGTGGCTGTGGAGACAAAAT R: AATCCCTGAAAGGCTTGGT	286bp	60°C
IFN $\gamma$	F: TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA R: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	92bp	60°C
TNF $\alpha$	F: GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTC R: CACTTGGTGGTTTGCTACGA	215bp	60°C
Perforina	F: GATGTGAACCCTAGGCCAGA R: GGTTTTTGTACCAGGCGAAA	161bp	60°C
Granzima	F: ATCAAGGATCAGCAGCCTGA R: TGATGTCATTGGAGAATGTCT	211bp	60°C
TGF-B1	F: AACCCCCATTGCTGTCCCGT R: CCTTGGTTCAGCCACTGCCG	196bp	60°C
SOCS3	F:AGCTCCAAAAGCGAGTACCA R: TGACGCTCAACGTGAAGAAG	178bp	60°C
GAPDH	F:AACGACCCCTTCATTGAC R: TCCACGACATACTCAGCAC	191bp	60°C
Ly49A	F: TTCATGACACCTTGCAAACAA R: GTCCAAGCTTTGGGGTATCA	180bp	60°C
Ly49B	F: GACCGTGCTAGAAATCATGG R: CTTTCATCTTCATCCCTCTGC	116bp	60°C
IL-1B	F: ATGGGCAACCACTTACCTATTT R: GTTCTAGAGAGTGCTGCCTAATG	94bp	60°C
VEGF $\alpha$	F: CACTTCCAGAAACACGACAAAC R: TGGAACCGGCATCTTTATCTC	95bp	60°C
IL-17a	F: GCTGGACCACCACATGAA R: GCATCTTCTCGACCCTGAAA	101bp	60°C

Fonte: Do autor

Nota: Sequências de primers utilizados para análise da expressão gênica no 6°, 10° e 14°ddg. Foi analisada a expressão de Perforina, Granzima B, Ly49A, Ly49B, Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (Vegf $\alpha$ ), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), *Toll like receptor* 4 (TLR4), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator transformador de crescimento-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Interleucina-17a (IL-17a), Supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o qual foi utilizado como endógeno.

#### 4.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS LINFOIDES INATAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (EUA)

Para as análises em citometria de fluxo as decíduas das prenhes dos grupos MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg foram isoladas como descrito na análise molecular, assim como as decíduas de fêmeas dos grupos F1RC e F1HI no 10°ddg. Após macerar o tecido e obter uma suspensão celular, foi adicionado a amostra 600µl de meio RPMI/FBS 10%. O macerado tecidual foi filtrado utilizando-se um tubo falcon 5ml estéril com tampa de filtro celular (modelo 12x75mm) (REF. 352235).

A suspensão celular foi dividida em 2 tubos falcon com 200µl cada. A seguir a amostra foi incubada com 3µl de anticorpo para a marcação de moléculas da superfície celular por 30 minutos em gelo e no escuro.

Tabela 5- A tabela representa os anticorpos de superfície celular utilizados no experimento.

Amostra tubo 1	Amostra tubo 2
CD127- PeCy7	CD127- PeCy7
CD3e- APC	CD3e- APC
ST2- Pe	

Fonte: Do autor

Nota: PeCy7, APC e Pe representam os fluorocromos aos quais cada anticorpo encontrava-se conjugado.

Após o tempo de 30 minutos foi inserido a cada tubo 1ml de RPMI/FBS 10% e os mesmos foram centrifugados por 4 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500µl de solução de fixação e permeabilização (BD Cytotfix/Cytoperm™) em cada tubo, os quais foram mantidos em gelo e no escuro por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com 1ml de RPMI/FBS 10% e centrifugação de 4 minutos a 14000 rpm e incubadas por 20 minutos no gelo e escuro com anticorpos primários anti-mouse para p-AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada) e IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase).

Tabela 6- A tabela apresenta os anticorpos para marcação intracelular.

Amostra tubo 1	Amostra tubo 2
p-AMPK	IDO

Fonte: Do autor

Nota: p-AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada; IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase.

Discorrido o tempo de 15 minutos, as amostras foram novamente lavadas e centrifugadas. As amostras foram, então, incubadas com 2 $\mu$ L de anticorpos secundários para p-AMPK e IDO e anticorpo para interleucina-10 (IL-10) por 15 min no gela e escuro.

Tabela 7- Anticorpo para IL-10 e anticorpos sedundários para p-AMPK e IDO.

Amostra tubo 1	Amostra tubo 2
Anti-habbit FITC	Anti-habbit Pe IL-10 FITC

Fonte: Do autor

Nota: FITC e Pe representam os fluorocromos aos quais cada anticorpo encontrava-se conjugado.

Ao final as amostras foram lavadas e centrifugadas e foi adicionado 300 $\mu$ L de solução de fixação. As análises das ILCs foram realizadas por citometria de fluxo em citômetro FACS-Calibur.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO NASO-ANAL DAS FÊMEAS DAS NINHADAS DE F1RC E F1HL

Foi analisado o número de filhotes nascidos vivos por mães, o peso e tamanho naso-anal destes filhotes nos grupos F1RC e F1HL.

#### 4.10 ÍNDICE DE LEE DA GERAÇÃO F1

Para averiguar o excesso de peso das fêmeas F1 foi realizado o Índice de Lee, o qual é calculado dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em gramas pelo comprimento naso-anal do animal em milímetros e multiplicado por 1000 [ $\sqrt[3]{\text{peso (g)}/\text{CNA(cm)}}$ ] (DE MOURA et al., 2009).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), portanto, a análise estatística foi realizada por meio de análise da variância (ANAVA) de duas vias seguida do teste de Sidak, Bonferroni ou Tukey, para análises de comparações múltiplas quando duas variáveis estavam

presentes. Para as análises com apenas uma variável foi utilizado o teste t não-pareado para dados paramétricos e teste de Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos. Todas as análises foram feitas por meio do software GraphPad Prism 7.0. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados como indicativos de significância. Os testes referentes a cada análise encontram-se indicados nas legendas das imagens.

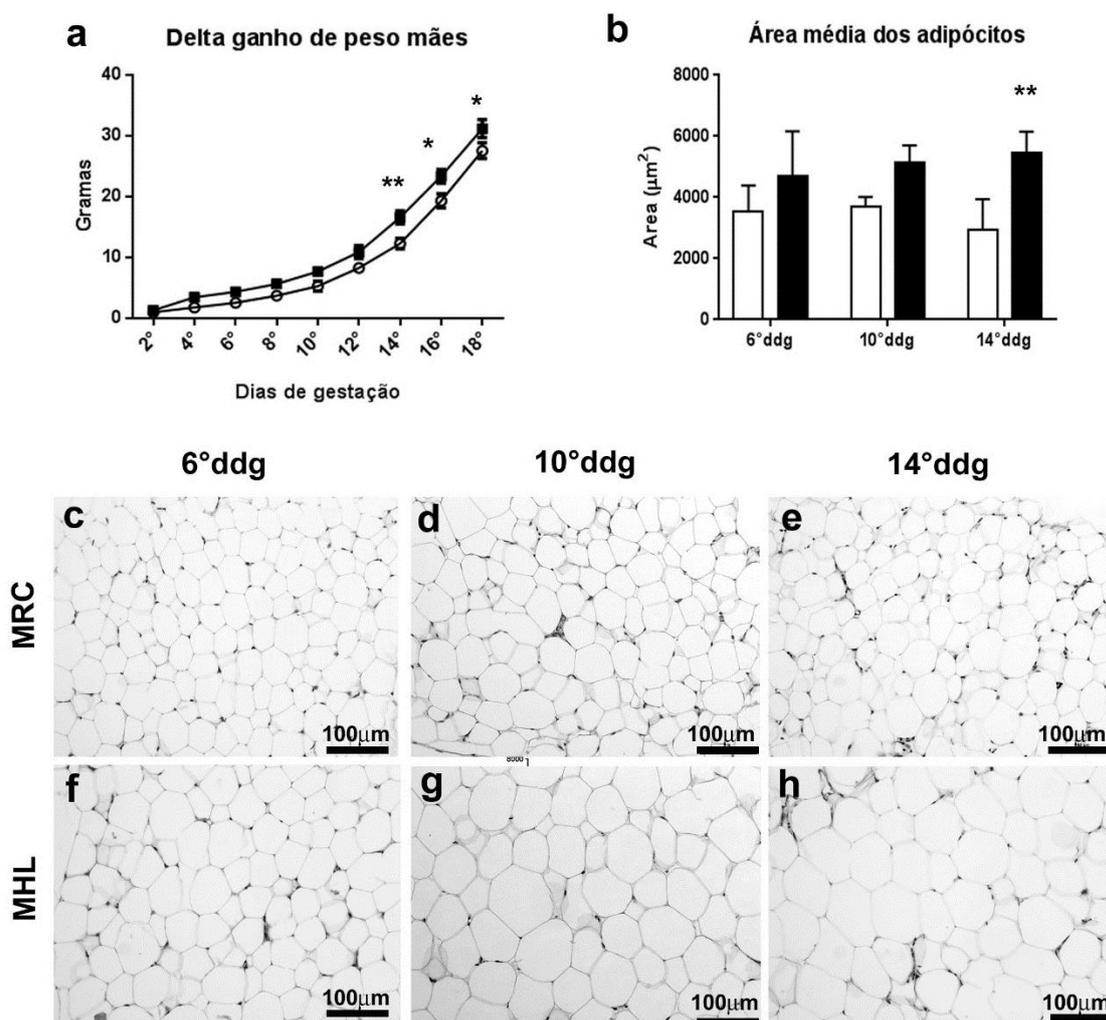
## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DO GANHO DE PESO MATERNO

Como apresentado na figura 2a houve aumento significativo no peso das mães que consumiram dieta hiperlipídica (MHL) em relação as mães do grupo controle (MRC) a partir do 14<sup>o</sup>ddg. A análise estatística mostrou que o delta médio do ganho de peso do grupo MRC foi de 12,30g ( $\pm$  2,96) no 14<sup>o</sup>ddg, 19,30g ( $\pm$ 3,94) no 16<sup>o</sup>ddg e 27,56g ( $\pm$  4,36) no 18<sup>o</sup>ddg enquanto o grupo MHL apresentou um delta médio de 16,60g ( $\pm$  2,87;  $p=0.0085$ ) no 14<sup>o</sup>ddg, 23,36g ( $\pm$  3;  $p= 0.0162$ ) no 16<sup>o</sup>ddg e 31,17g ( $\pm$  3,87;  $p= 0.0456$ ).

Os resultados obtidos a partir da análise morfométrica do tecido adiposo branco perigonadal (FIGURA 2b) corroboram com os resultados de ganho de peso das mães uma vez que no 14<sup>o</sup>ddg a área média dos adipócitos do grupo MRC ( $2924,108 \mu\text{m}^2 \pm 1022,269 \mu\text{m}^2$ ) foi menor do que a área apresentada por fêmeas do grupo MHL ( $5476,584 \mu\text{m}^2 \pm 670,611 \mu\text{m}^2$ ) ( $p=0.0024$ ).

Figura 2- Análises de ganho de peso e morfométrica do tecido adiposo perigonadal materno



Fonte: Do autor

Nota: Ganho de peso dos grupos MRC e MHL exibindo o delta médio do peso das fêmeas do 2° ao 18°ddg (\*\*) $p=0,0085$ ; (\*) $p=0,0162$ ; (\*) $p=0,0456$ , análise realizada pelo teste de ANOVA 2 vias e teste de Sidak para comparações múltiplas (a). O gráfico mostra a área média dos adipócitos de cada grupo, (\*\*) $p=0,0024$ , análise realizada pelo teste de ANOVA 2 vias e teste Tukey para comparações múltiplas (b). Microscopia de luz do grupo MRC no 6°ddg (c), 10°ddg (d) e 14°ddg (e). Microscopia de luz do grupo MHL no 6°ddg (f), 10°ddg (g) e 14°ddg (h). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

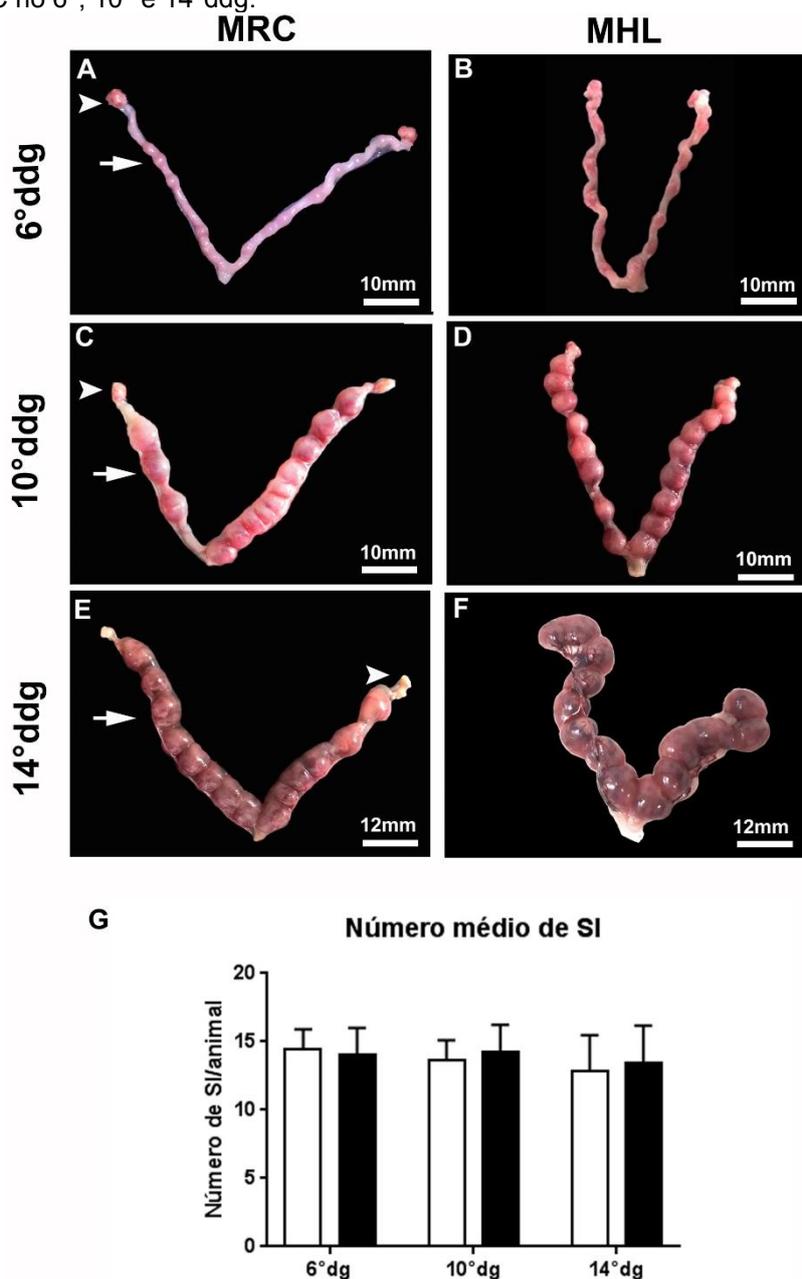
## 5.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL DOS GRUPOS MRC E MHL

Em todos os animais eutanasiados nos diferentes dias de gestação foram constatados sítios de implantação embrionária e foram, portanto, diagnosticados como prenhes. A análise macroscópica dos sítios de implantação dos animais controle possuíam aspecto normal e formavam uma estrutura do tipo “colar de contas”, característico do útero de murinos.

Na figura 3a e 3b podemos observar úteros no 6ºddg de MRC e MHL respectivamente, os cornos uterinos eram finos e o SI pequenos, de tamanho semelhante aos ovários, havia maior espaço entre eles e apresentavam coloração rosada. Já nas figuras 3c e 3d podem ser observados útero de fêmeas MRC e MHL no 10ºddg, com os sítios de implantação maiores do que os presentes no 6ºddg. É possível observar que os SI possuem coloração mais avermelhada e há pouco ou nenhum espaço entre eles. No 14ºddg os SI de ambos os grupos eram grandes (FIGURAS 3e e 3f), com a porção anti-mesometrial, onde encontra-se o feto em desenvolvimento, de cor mais clara em relação a porção mesometrial, onde encontra-se a placenta e a decídua basal. Os SI de ambos os grupos tinham aspectos macroscópicos semelhantes.

A análise do número médio de SI (FIGURA 3g) revelou no 6ºddg a média de SI/animais no grupo MRC era semelhante à média apresentada pelo grupo MHL ( $p= 0.9881$ ). O mesmo ocorreu no 10º ( $p= 0.9618$ ) e no 14ºddg ( $p= 0.918$ ). Tais resultados indicam que não houve diminuição da viabilidade gestacional no grupo MHL.

Figura 3- Análise macroscópica dos cornos uterinos e sítios de implantação dos grupos MHL e MRC no 6°, 10° e 14°ddg.



Fonte: Do autor

Nota: Útero com sítios de implantação de fêmeas MRC (a) e MHL (b) no 6° dia de gestação (ddg). Útero com sítios de implantação de fêmeas MRC (c) e MHL (d) no 10°ddg. Cornos uterinos de fêmeas MRC (e) e MHL (f) no 14°ddg. Gráfico mostrando o número médio de sítios de implantação (SI), barras brancas representam o grupo MRC e barras pretas representam o grupo MHL (g). As cabeças de setas indicam os ovários, as setas indicam os sítios de implantação. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

A tabela abaixo mostra os valores de F e p encontrados na análise de ANOVA-2 vias para a análise do número médio de sítios de implantação por animal do grupo MRC e MHL.

Tabela 8- Valores de F e p para o número médio de SI/animal.

	F (DFn, DFd)	Valor de P
Interação	F (2, 24) = 0,1799	P=0,8365
Tempo	F (2, 24) = 0,6978	P=0,5075
Dieta	F (1, 24) = 0,1151	P=0,7374

Após a análise macroscópica dos SI esses foram analisados em microscopia de luz para verificar a ocorrência de alterações morfológicas e na estrutura tecidual. Como podemos observar na figura 4a, como esperado, as fêmeas do grupo MRC no 6<sup>o</sup>ddg apresentavam o embrião (E) em processo de implantação posicionada em uma porção de luz (L) uterina. Ao redor do embrião pode-se observar a ocorrência do processo de decidualização, reconhecido na imagem por sua coloração mais acentuada à hematoxilina e, na porção mais externa, há o miométrio (Mi) bem delimitado e circundando todo o sítio de implantação.

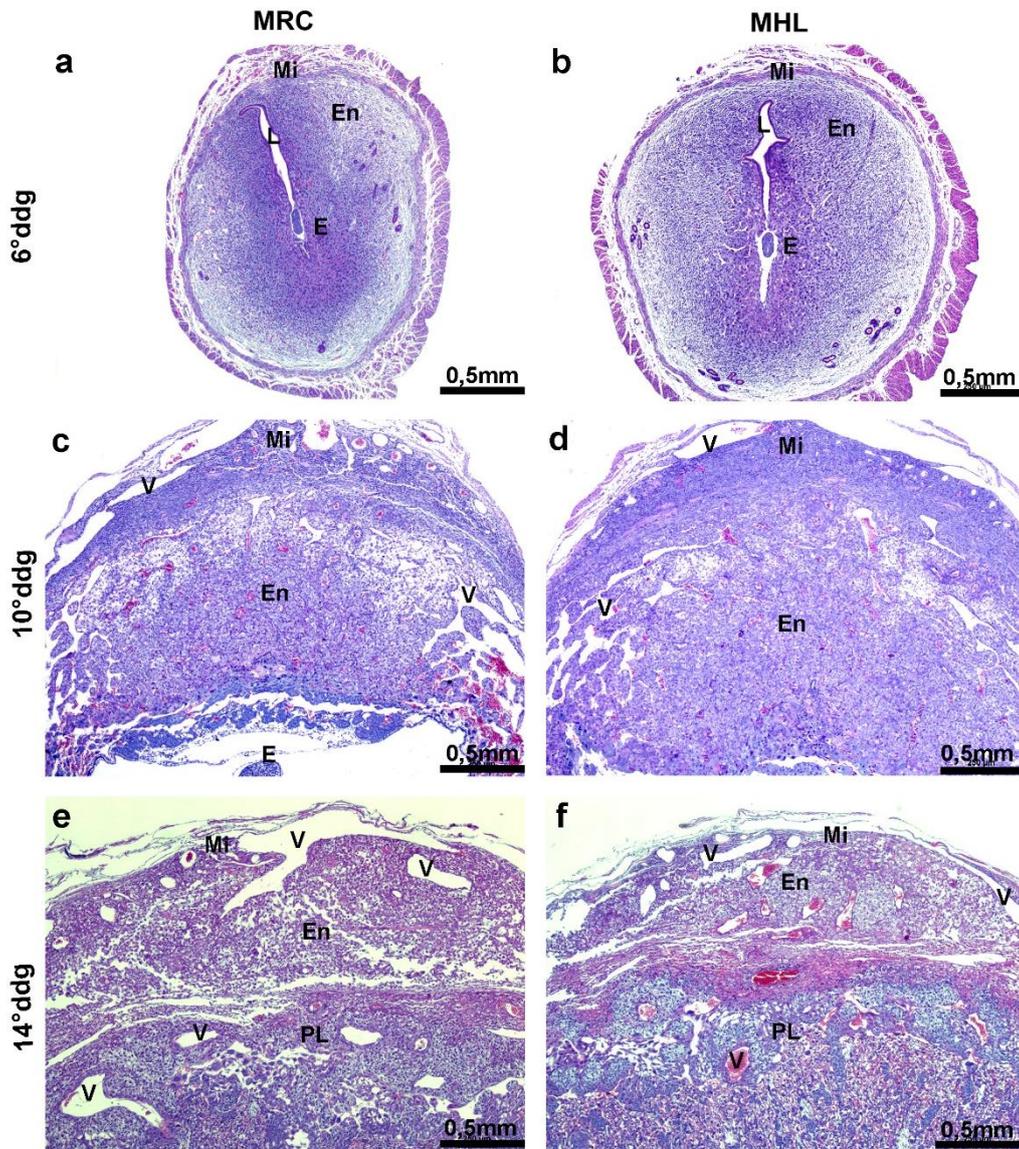
No grupo MHL no 6<sup>o</sup>ddg (FIGURA 4b) não foram observadas grandes alterações com relação a morfologia microscópica. Nestes animais o processo de decidualização também foi observado. Assim como no grupo controle os embriões em MHL encontravam-se localizados na luz uterina e não haviam indícios de morte embrionária. Entretanto, os SI de MHL aparentavam estar ligeiramente maiores em relação ao grupo controle.

A análise microscópica dos sítios de implantação de fêmeas que receberam a ração controle e foram eutanasiadas no 10<sup>o</sup>ddg (FIGURA 4c) revelou sítios contendo grande quantidade de células, principalmente na região do endométrio, onde também foi constatada a presença de grande quantidade de vasos sanguíneos, os quais formavam uma rede vascular por onde passa o sangue materno. O mesmo foi observado nos sítios de implantação das fêmeas do grupo MHL no 10<sup>o</sup>ddg (FIGURA 4d), entretanto, a região de decídua basal dos sítios dessas fêmeas aparentavam estarem maiores em relação ao grupo MRC.

Com relação aos sítios de implantação dos animais no 14<sup>o</sup>ddg, as fêmeas do grupo MRC (FIGURA 4e) apresentavam uma decídua reduzida em relação ao grupo controle no 10<sup>o</sup>ddg, o que era esperada, uma vez que o desenvolvimento da placenta leva a uma diminuição da área de endométrio nos

sítios de implantação. Também foi observado a presença de grande quantidade de células e vasos sanguíneos formando redes, tanto na porção de endométrio como na porção de placenta. A morfologia apresentada pelos sítios de implantação das fêmeas do grupo MHL (FIGURA 4f) foi semelhante ao grupo controle, entretanto notou-se que possa estar ocorrendo um aumento mais expressivo da placenta de fêmeas MHL. O aumento mais acentuado da placenta pode também levar a uma redução mais acentuada da porção de decídua (endométrio), a qual parece estar em relação ao grupo controle (FIGURA 4f).

Figura 4- Análise microscópica dos sítios de implantação dos grupos MHL e MRC no 6°, 10° e 14°ddg.



Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografia dos sítios de implantação do grupo MRC no 6°ddg (a), 10°ddg (c) e 14°ddg (e). Fotomicrografias dos sítios de implantação do grupo MHL 6°ddg (b), 10°ddg (d) e 14°ddg (f). Mi- miométrio, En- endométrio, E- embrião, PL- placenta, V- vaso sanguíneo.

### 5.3 ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DAS CÉLULAS uNK

Nas três regiões localizadas na porção mesometrial dos sítios de implantação dos animais no 6°, 10° e 14°ddg foram identificadas células uNK fortemente reativas à lectina DBA, as quais são denominadas células uNK DBA<sup>+</sup>.

Por meio da técnica de histoquímica de lectina DBA foi possível a distinção dos 4 subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup>, quando estes estavam presentes (FIGURA 5). Como descrito por Paffaro e colaboradores (2003), os subtipos de células uNKDBA<sup>+</sup> podem ser diferenciados devido à sua reatividade à lectina DBA e seus aspectos morfológicos. O subtipo I foi descrito como sendo uma célula pequena e arredondada, com pouca área citoplasmática e núcleo com heterocromatina predominante, sem nucléolo evidente, sua morfologia se assemelha a um linfócito e sua membrana é fortemente reativa à lectina DBA (FIGURA 5a). Já subtipo II foi caracterizado como tendo uma área de citoplasma ligeiramente maior que as células do subtipo I e apresenta poucos grânulos citoplasmáticos que, assim como sua membrana, reagem fortemente com a lectina DBA (FIGURA 5b).

O subtipo III de célula uNK DBA<sup>+</sup> é o subtipo mais diferenciado, é maior que o subtipos I e II, possui grande área de citoplasma onde observa-se uma grande quantidade de grânulos citoplasmáticos, tanto seus grânulos quanto sua membrana plasmática são reativos à lectina DBA. O subtipo III, ainda, apresenta o núcleo com eucromatina predominante e nucléolo evidente, o que indica uma grande atividade de síntese de proteínas (FIGURA 5c).

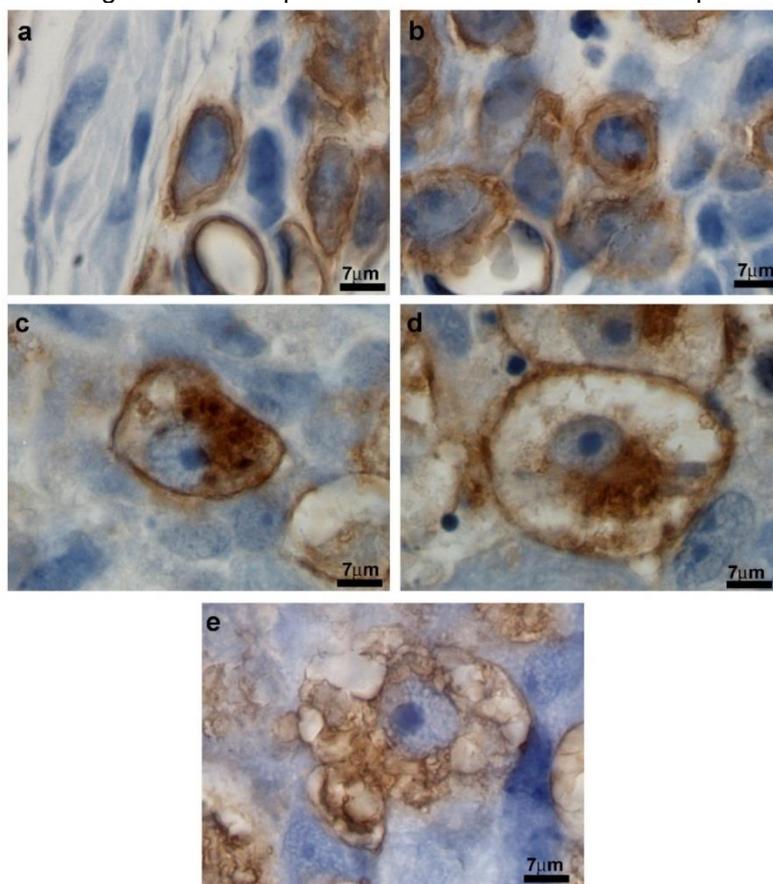
As células do subtipo IV são consideradas o subtipo senescente de células uNK DBA<sup>+</sup> devido à sua morfologia. Este subtipo apresenta um conteúdo granular variável que, quando presente, reage fortemente à lectina DBA, seu citoplasma apresenta regiões que se assemelham a extrações citoplasmáticas e ainda se pode observar marcação para lectina DBA em sua membrana plasmática (FIGURA 5d), porém esta marcação pode ser descontínua.

Além dos 4 subtipos caracterizados espaço-temporalmente por Paffaro e colaboradores (2003), em nosso estudo ainda foi observado um quinto subtipo de célula uNK DBA<sup>+</sup>, o qual foi caracterizado por Zavan e colaboradores

(2016). Este subtipo apresenta baixa reatividade à lectina DBA, com ausência de marcação na membrana ou em seus grânulos citoplasmáticos, além disso, seus grânulos podem possuir o aspecto de estarem vazios e normalmente não há sinais de extração no citoplasma destas células (FIGURA 5e).

Devido as suas características heterogêneas àquelas descritas para os subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup>, este subtipo foi considerado como sendo um subtipo de célula uNK alterado. Como este subtipo apresenta alteração na sua reatividade à lectina DBA recebeu a denominação de uNK DBA<sup>low</sup> (ZAVAN et al., 2016). Ressalta-se que células uNK DBA<sup>-</sup> não foram avaliadas neste trabalho.

Figura 5- Fotomicrografia dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> e o subtipo DBA<sup>low</sup>.



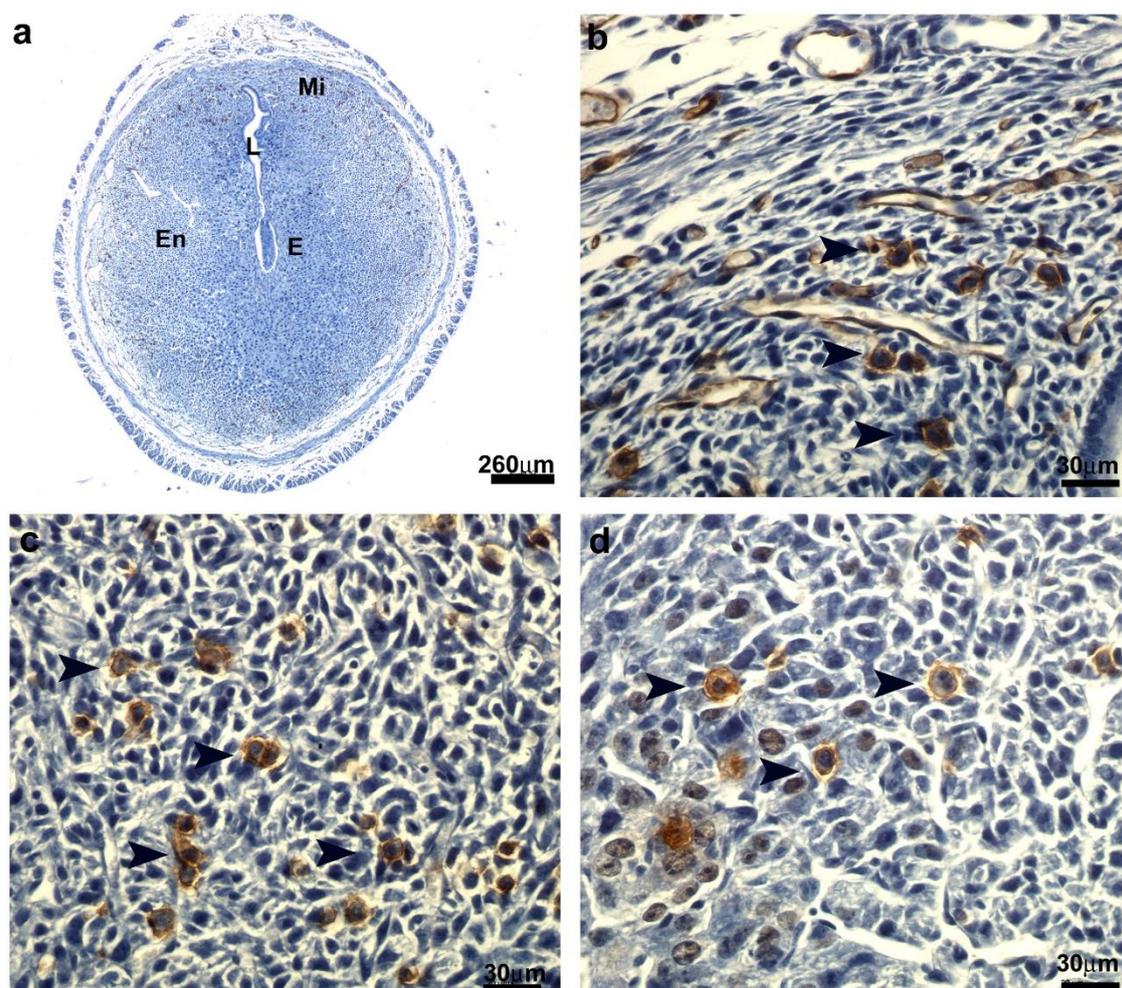
Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias dos 3 subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup>. Subtipo I (a), subtipo II (b), subtipo III (c), subtipo IV (d) e o subtipo alterado de células uNK, uNK DBA<sup>low</sup> (e).

A análise histoquímica no 6ºddg de fêmeas MRC mostrou a presença de células uNK DBA<sup>+</sup> na região do endométrio (FIGURA 6a). Embora o número de

células fosse pequeno a maioria se assemelhava aos subtipos I e II e se distribuíam por todas as 3 regiões do SI (FIGURAS 6b, c e d) mas se localizam, preferencialmente, na região 1 (FIGURA 6b).

Figura 6- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6ºddg do grupo MRC.



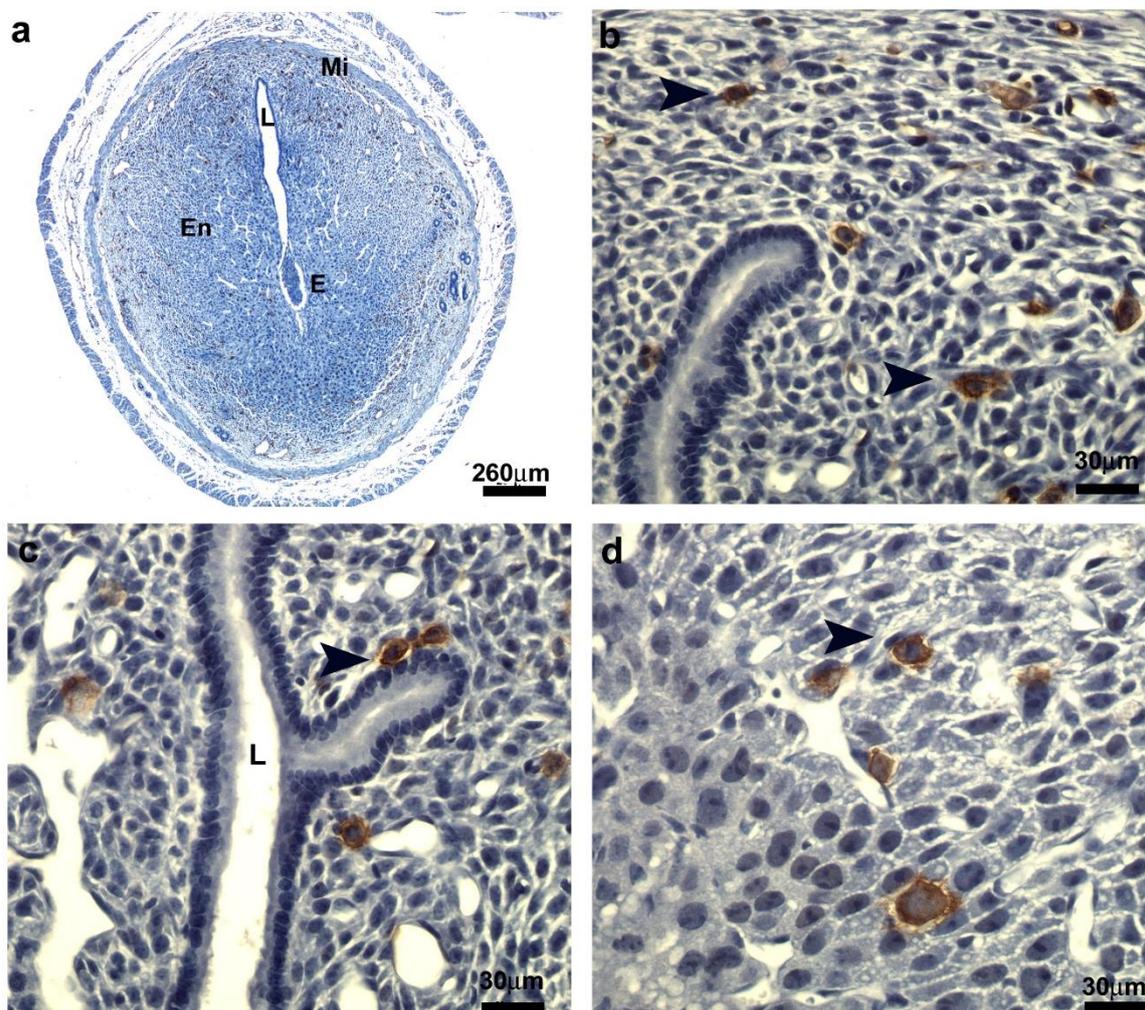
Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6ºddg do grupo MRC. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 6ºddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). As cabeças de seta indicam células uNK DBA<sup>+</sup>. Mi- miométrio, En- endométrio, E- embrião e L- luz uterina.

Assim como no grupo MRC, no grupo MHL no 6ºddg (FIGURA 7a) foram encontradas poucas células uNK e, em sua maioria, possuíam morfologia semelhante aos subtipos I e II, estas células se distribuíam pelas 3 regiões dos SI (FIGURAS 7b, c e d) e o número de células uNK com morfologia alterada

era inexpressivo.

Figura 7- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6ºddg do grupo MHL.



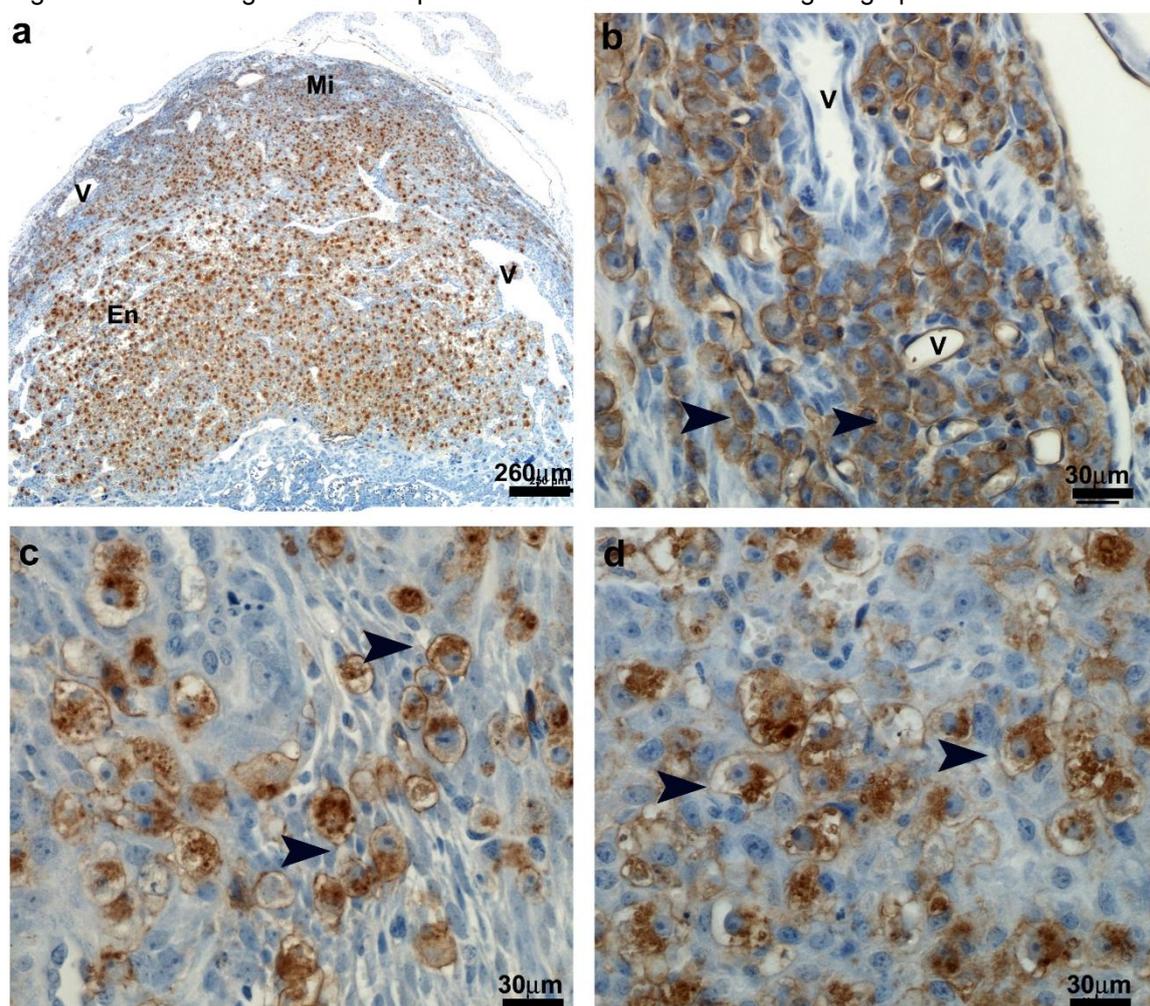
Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 6ºddg do grupo MHL. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 6ºddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). As cabeças de seta indicam células uNK DBA<sup>+</sup>. Mi- miométrio, En- endométrio, E- embrião e L- luz uterina.

Nos sítios de implantação de mães controle no 10ºddg foi possível observar uma grande quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> por toda a região de decídua basal (FIGURA 8a). Foi observada grande quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> dos subtipos I e II na região 1 (FIGURA 8b), grande quantidade de células do subtipo III na região 2 (FIGURA 8c) e um alto número de células uNK DBA<sup>+</sup> do subtipo IV na região 3 (FIGURA 8d). Como esperado, todos os

subtipos presentes eram fortemente reativos à lectina DBA.

Figura 8- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10ºddg do grupo MRC.

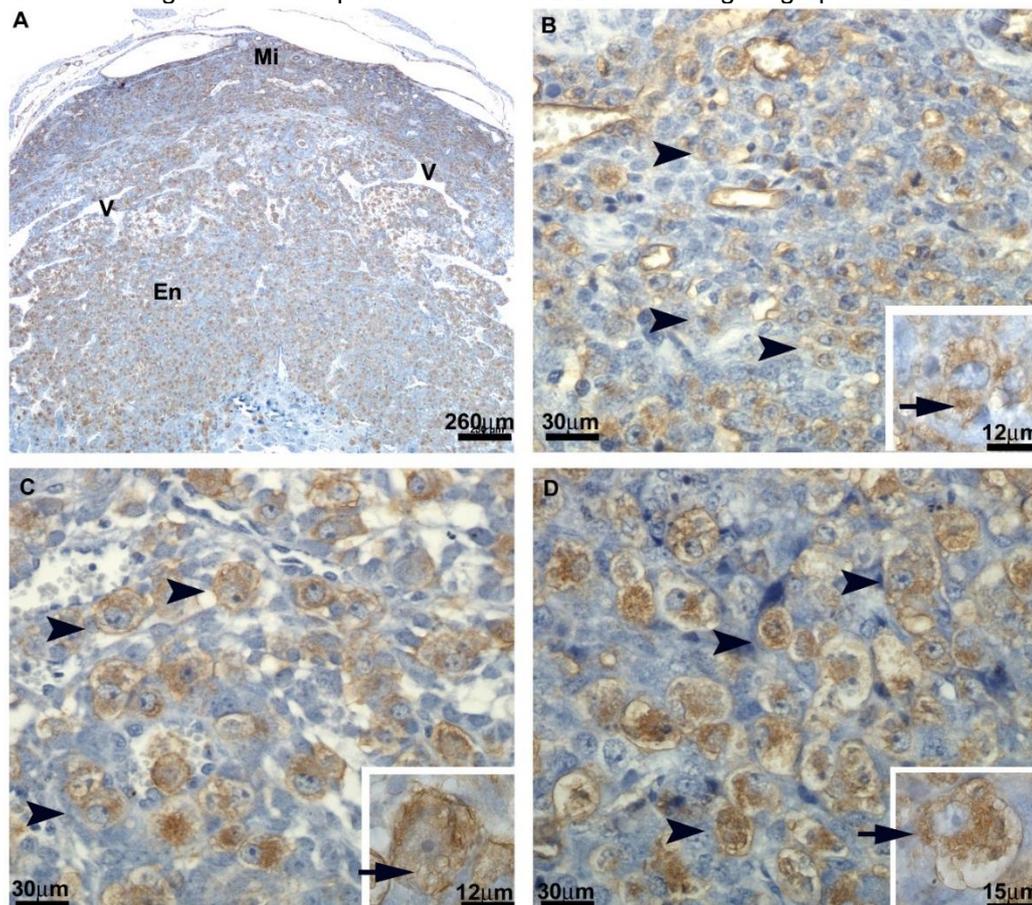


Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10ºddg do grupo MRC. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 10ºddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). As cabeças de seta indicam células uNK DBA<sup>+</sup>. Mi- miométrio, En- endométrio, e V- vasos sanguíneos.

No grupo MHL no 10ºddg (FIGURA 9) também foi observado um grande número de células uNK distribuídas por todas as 3 regiões do SI (FIGURA 9a), desde a região do miométrio até a região mais próxima ao embrião. Entretanto, as células uNK presentes possuíam baixa reatividade à lectina DBA e seus grânulos possuíam aspecto de estarem vazios, o que é característico de células uNK DBA<sup>low</sup> (destaques das FIGURAS 9b, c e d). Como podemos observar na figura 9, esse subtipo alterado foi encontrado tanto na região 1 (FIGURA 9b), quanto nas regiões 2 (FIGURA 9c) e 3 (FIGURA 9d).

Figura 9- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10°ddg do grupo MHL.

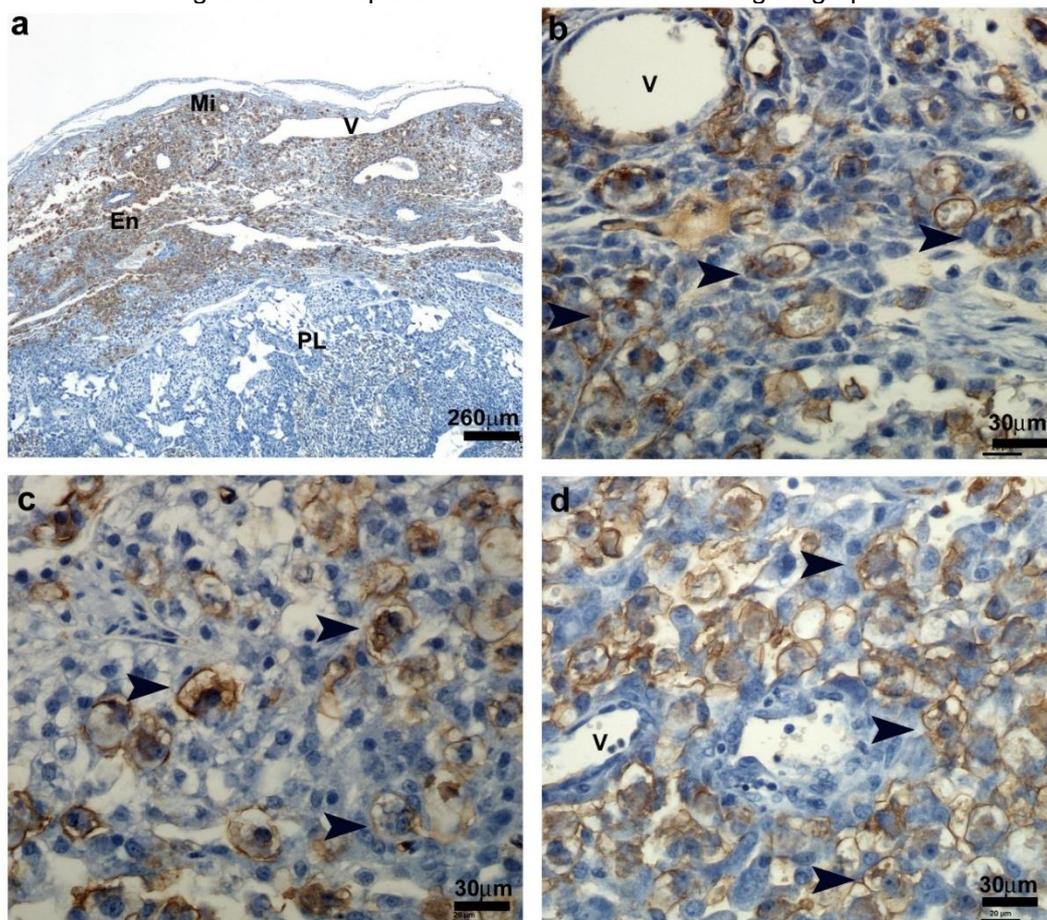


Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10°ddg do grupo MHL. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 10°ddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). Os detalhes mostram células uNK DBA<sup>low</sup> (100x). As cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>low</sup>, as setas indicam grânulos com aspecto de estarem vazios. Mi- miométrio, En- endométrio, e V- vasos sanguíneos.

Com relação a análise histoquímica dos SI no 14°ddg, esta revelou que os SI de fêmeas MRC (FIGURA 10a) ainda apresentavam grande quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> fortemente reativas à lectina DBA e que estas se distribuíam por todo o endométrio. Tanto na região 1 (FIGURA 10b), quanto na 2 (FIGURA 10c) e 3 (FIGURA 10d), a maioria das células ali presentes foram caracterizadas como sendo do subtipo IV, o que era esperado para o 14° dia de gestação de camundongos.

Figura 10- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14<sup>o</sup>ddg do grupo MRC.

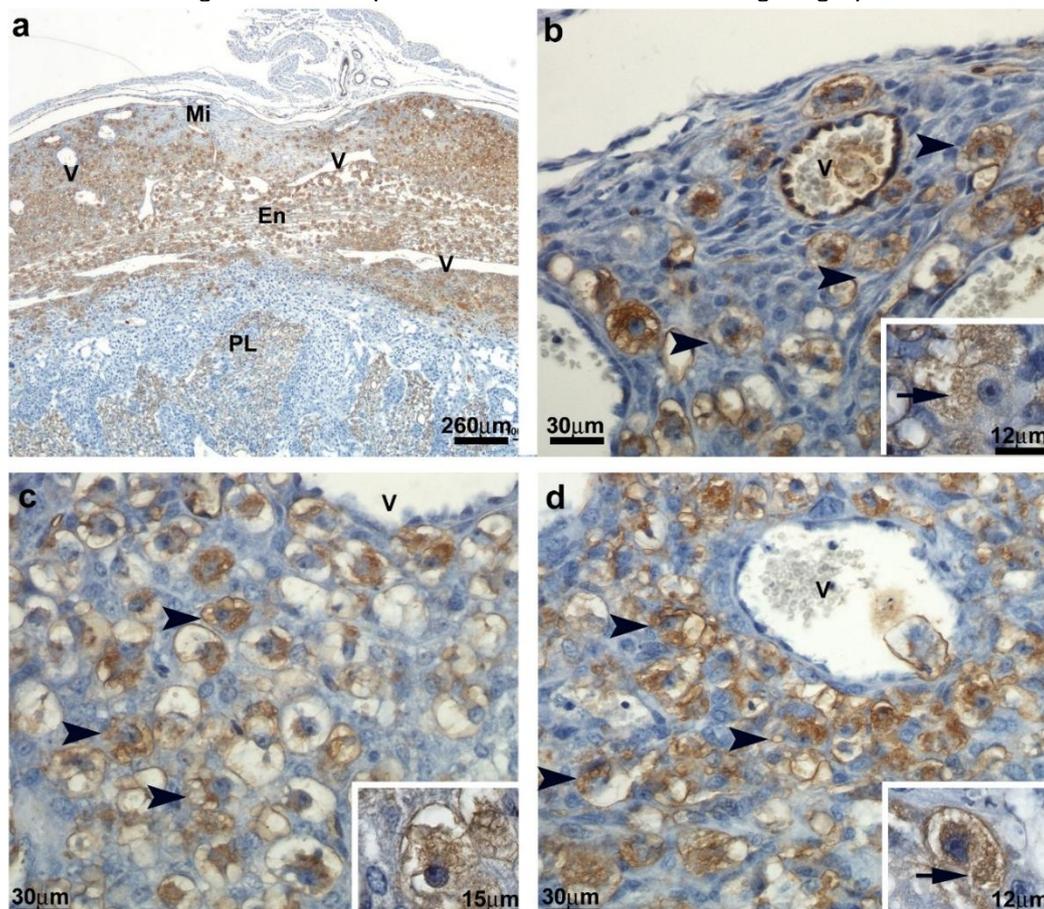


Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14<sup>o</sup>ddg do grupo MRC. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 14<sup>o</sup>ddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). As cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>+</sup>. Mi- miométrio, En- endométrio, PL- placenta e V- vasos sanguíneos.

No grupo MHL as células uNK se distribuíam de maneira semelhante ao grupo controle (FIGURA 11a) e a morfologia das células era similar às células do subtipo IV encontradas no grupo MRC. Entretanto, assim como observado no grupo MHL no 10<sup>o</sup>ddg, as células uNK presentes neste grupo mostravam alteração na reatividade para lectina DBA em suas membranas e foi possível constatar a presença de células com conteúdo granular variável (destaques FIGURAS 11b, c e d). Foi, portanto, constatada a presença de células uNK DBA<sup>low</sup> nas 3 regiões do sítio de implantação de fêmeas MHL no 14<sup>o</sup>ddg (FIGURAS 11b, c e d).

Figura 11- Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14°ddg do grupo MHL.



Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 14°ddg do grupo MHL. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 14°ddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). Os detalhes mostram células uNK DBA<sup>low</sup> (100x). As cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>low</sup>, as setas indicam grânulos com aspecto de estarem vazios. Mi- miométrio, En- endométrio, e V- vasos sanguíneos.

Os resultados da análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> corroboraram com as observações feitas em microscopia sobre os diferentes grupos experimentais (FIGURA 12).

No 6°ddg foi observada pequena quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> na decídua basal, sendo que os SI e SII predominavam nas 3 regiões dos sítios de implantação de fêmeas MRC e MHL. Não foram identificadas diferenças estatísticas na quantidade dos subtipos celulares quando comparados esses dois grupos, ou seja, o consumo de dieta HL do 1° ao 6°ddg não alterou a quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> (FIGURAS 12a, b e c).

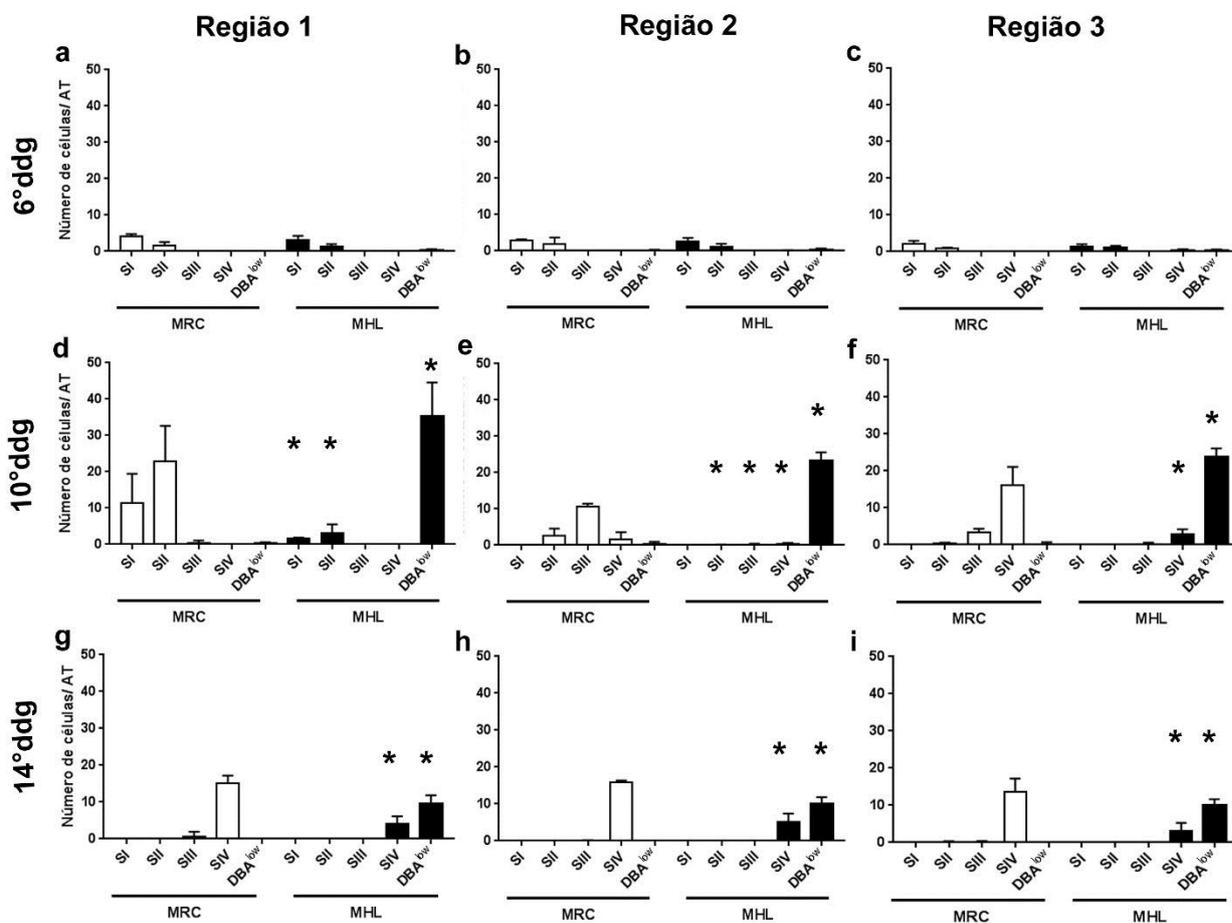
No 10°ddg, os animais do grupo MRC apresentaram grande quantidade

de células uNK DBA<sup>+</sup> nas 3 regiões dos sítios de implantação, com predominância de células SI ( $11,31 \pm 8,14$  células/AT) e SII ( $22,91 \pm 9,73$  células/AT) na R1, maior quantidade de células SIII ( $10,6 \pm 0,89$  células/AT) na R2 e predominância de células SIV ( $16 \pm 5,1$  células /AT) na R3. Já o grupo MHL apresentou redução na quantidade de SI ( $3 \pm 2,53$  células/AT) e SII ( $0,04 \pm 0,06$  células/AT) na R1, de SIII na R2 ( $0,2 \pm 0,3$  células/AT) e de SIV na R3 ( $2,8 \pm 1,4$  células/AT) concomitante a um aumento significativo de células uNK DBA<sup>low</sup> nestas 3 regiões (R1=  $35,1 \pm 9,4$  células/AT; R2=  $23,1 \pm 2,4$  células/AT; R3=  $23,8 \pm 2,3$  células/AT).

Com relação ao 14<sup>o</sup>ddg a análise estereológica mostrou que o grupo MRC apresentava predominância de células uNK DBA<sup>+</sup> SIV na R1 ( $15,08 \pm 2,11$  células/AT), R2 ( $15,97 \pm 0,33$  células/AT) e R3 ( $13,75 \pm 3,43$ ) dos sítios de implantação. No grupo de dieta HL a quantidade deste mesmo subtipo foi menor tanto em R1 ( $4,13 \pm 2$  células/AT), quanto em R2 ( $5,13 \pm 2,28$  células/AT) e R3 ( $3,18 \pm 2,09$  células/AT), concomitante ao aumento de células uNK DBA<sup>low</sup> nas 3 regiões dos sítios de implantação (R1=  $9,55 \pm 2,30$  células/AT; R2=  $9,90 \pm 1,96$  células/AT; R3=  $10,04 \pm 1,60$  células/AT).

Os valores de F e p encontrados na análise estereológica encontram-se na tabela 9. Os dados com todos os valores de média e desvio estão presentes no anexo a tabelas 4, 5 e 6.

Figura 12- Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> nos grupos MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg



Fonte: Do autor

Nota: Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> e do subtipo DBA<sup>low</sup> nos grupos MRC e MHL no 6°, 10° e 14° dia de gestação (dg). \* ( $p < 0,05$ ) comparação entre o mesmo subtipo. Testes estatísticos utilizados foram ANOVA 2 vias e teste Newman-Keuls.

Tabela 9- Valores de F e p para a análise estereológica dos grupos MRC e MHL.

		F (DFn, DFd)			Valor de P		
		Interação	Subtipo	Dieta	Interação	Subtipo	Dieta
6°ddg	R1	F <sub>(4,40)</sub> = 1,821	F <sub>(4,40)</sub> = 81,63	F <sub>(1,40)</sub> = 1,928	P=0,1438	P<0,0001	P=0,1727
	R2	F <sub>(4,40)</sub> = 0,67	F <sub>(4,40)</sub> = 27,11	F <sub>(1,40)</sub> = 0,8892	P=0,6149	P<0,0001	P=0,3513
	R3	F <sub>(4,40)</sub> = 1,792	F <sub>(4,40)</sub> = 23,87	F <sub>(1,40)</sub> = 0,0997	P=0,1494	P<0,0001	P=0,7538
10°ddg	R1	F <sub>(4,40)</sub> = 41,25	F <sub>(4,40)</sub> = 23,69	F <sub>(1,40)</sub> = 0,4523	P<0,0001	P<0,0001	P=0,5051
	R2	F <sub>(4,40)</sub> = 269	F <sub>(4,40)</sub> = 163,6	F <sub>(1,40)</sub> = 24,4	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001
	R3	F <sub>(4,40)</sub> = 130,6	F <sub>(4,40)</sub> = 90,6	F <sub>(1,40)</sub> = 6,621	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0139
14°ddg	R1	F <sub>(4,40)</sub> = 85,19	F <sub>(4,40)</sub> = 116,4	F <sub>(1,40)</sub> = 1,465	P<0,0001	P<0,0001	P=0,2333
	R2	F <sub>(4,40)</sub> = 147,2	F <sub>(4,40)</sub> = 239,2	F <sub>(1,40)</sub> = 0,591	P<0,0001	P<0,0001	P=0,4465
	R3	F <sub>(4,40)</sub> = 70,4	F <sub>(4,40)</sub> = 79,28	F <sub>(1,40)</sub> = 0,1653	P<0,0001	P<0,0001	P=0,6865

Fonte: Do autor

Nota: Tabela mostra os valores de F (grau de variação amostral) e P (significância) para a análise de ANOVA 2 vias da análise estereológicas dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> dos grupos MRC e MHL.

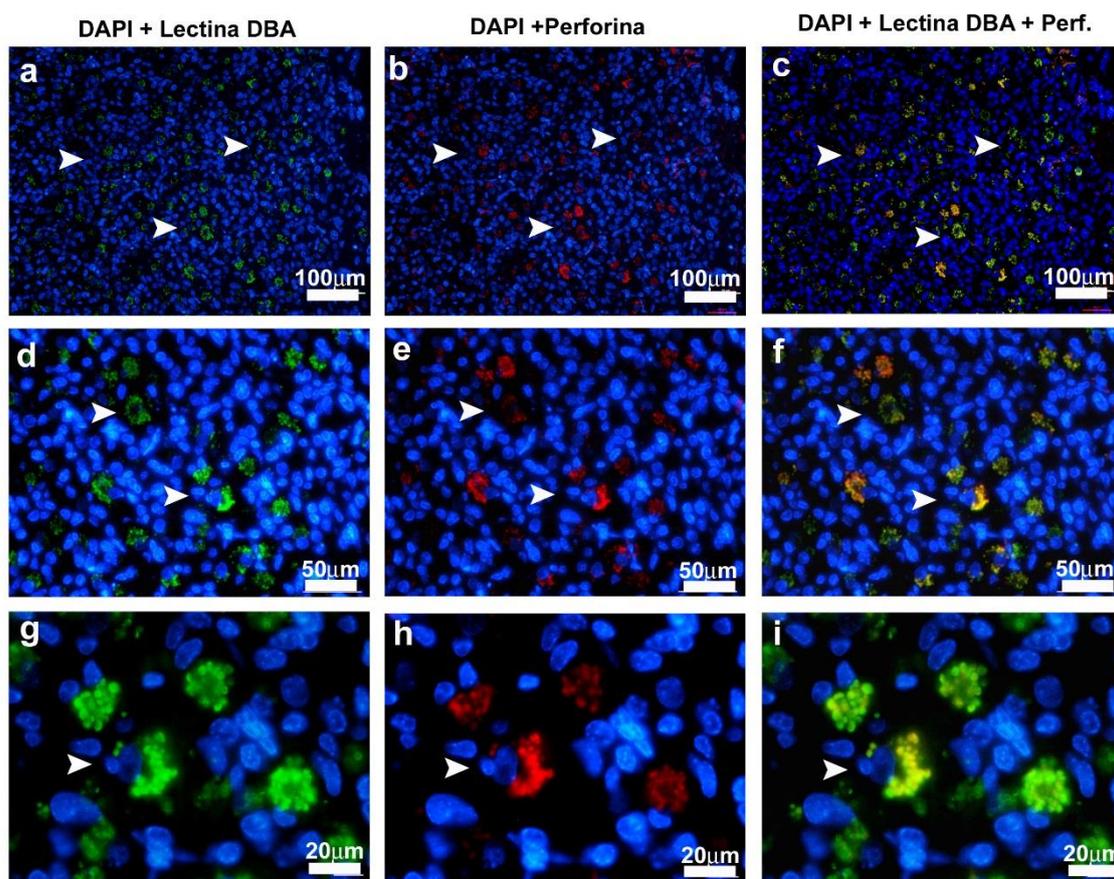
## 5.4 ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

### 5.4.1 Análise de imunofluorescência para perforina

Nos sítios de implantação no 10°ddg foi realizada a técnica de imunofluorescência para verificar a reatividade das células uNK ao anti-perforina (FIGURA 13). Para a isso foi feita uma dupla marcação, na qual foi utilizada a lectina DBA (FIGURAS 13a, d e g) para a detecção das células uNK DBA<sup>+</sup> e o anti-perforina (FIGURAS 13b, e e h) para análise da presença de perforina nos grânulos destas células (FIGURAS 13c, f e i). Foi possível constatar que nos SI de fêmeas MRC havia grande quantidade de células positivas à lectina DBA, assim como observado anteriormente (FIGURA 13a). Também foi constatado que essas células apresentavam grânulos altamente reativos à lectina e que esses grânulos tinham o aspecto de estarem cheios (FIGURAS 13d e g).

A utilização do anti-perforina permitiu a observação de dirvesas células com grânulos positivas para perforina nos SI de MRC (Figura12b). Juntamente com a lectina DBA, foi possível comprovar que as células que apresentavam grânulos altamente reativos ao anti-perforina eram células uNK DBA<sup>+</sup> (FIGURAS 13c, f e i), uma vez que as marcações estavam co-localizadas.

Figura 13- Imunofluorescência para perforina do grupo MRC no 10°ddg.



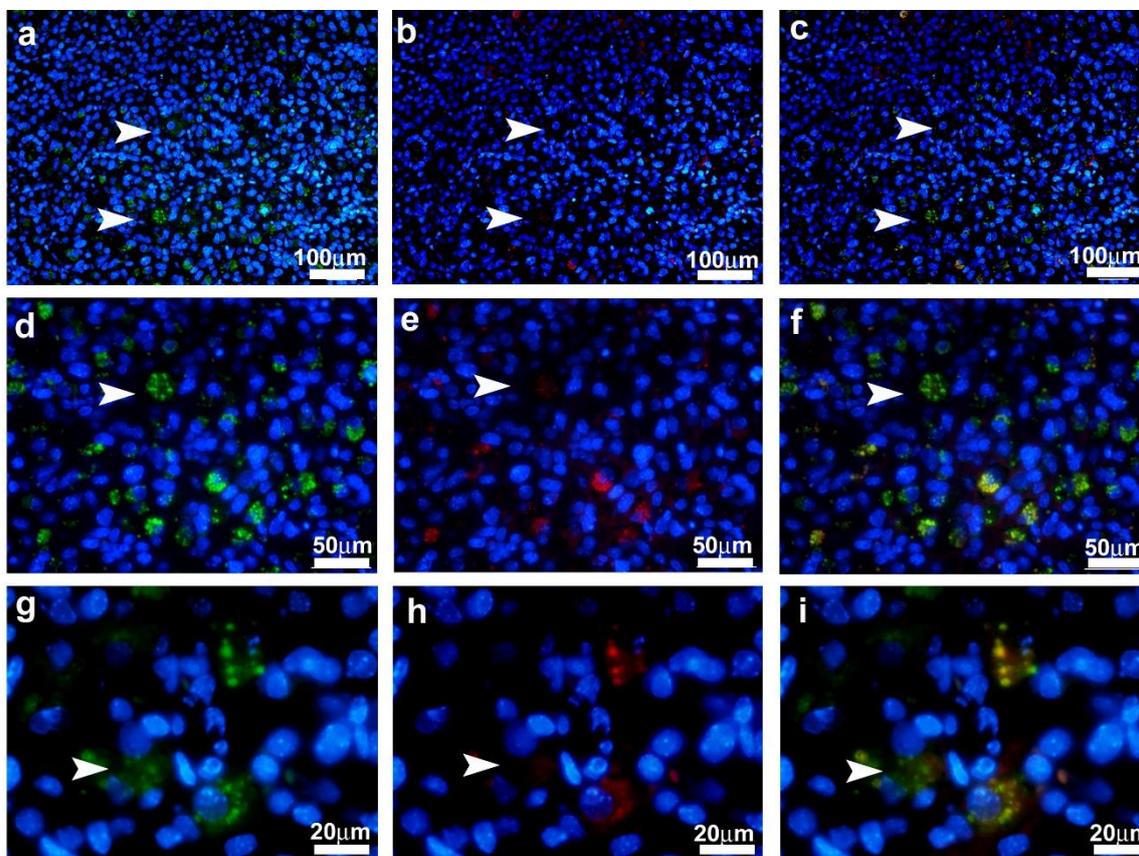
Fonte: Do autor

Nota: Fotomicrografias de imunofluorescência para perforina (vermelho) com dupla marcação para lectina DBA (verde) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul) no sítio de implantação de fêmeas do grupo MRC no 10°ddg. Marcação com lectina DBA e DAPI mostrando células uNK, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos reativos à lectina em 20x (a), 40X (d) e 100x (g). Marcação para perforina e DAPI mostrando células uNK, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos reativos ao anti-perforina em 20x (b), 40X (e) e 100x (h). Sobreposição das marcações de lectina DBA e perforina, as cabeças de setas indicam células uNK com grânulos reativos à lectina e ao anti-perforina em 20x (c), 40X (f) e 100x (i).

Já com relação ao SI de mães HL foi observado um grande número de células positivas à lectina DBA no endométrio, assim como observado anteriormente (FIGURA 14a). Entretanto, a marcação à lectina DBA estava visivelmente mais fraca em relação ao grupo controle. O mesmo ocorreu com a reatividade ao anti-perforina, as figuras 14g e h mostram com detalhe células pouco reativas à lectina DBA e à perforina, respectivamente. A figura 14i mostra em detalhe os grânulos de células uNK com a reatividade alterada tanto à lectina DBA quanto ao anti-perforina. A morfologia dos grânulos e sua

reatividade aos marcadores indica que pode ter ocorrido mobilização de perforina.

Figura 14- Imunofluorescência para perforina do grupo MHL no 10<sup>o</sup>ddg.



Fonte: Do autor

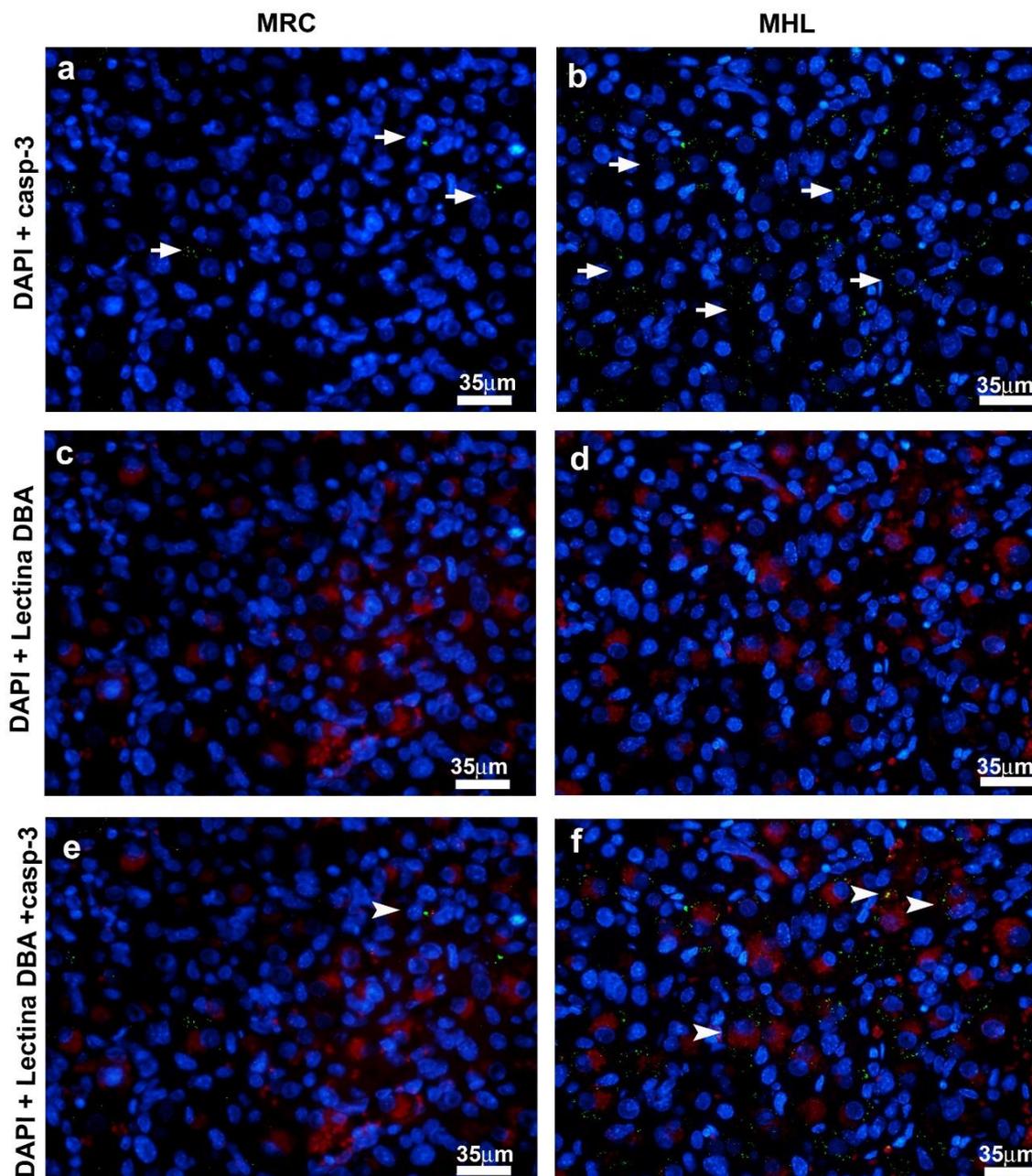
Nota: Fotomicrografias de imunofluorescência para perforina (vermelho) com dupla marcação para lectina DBA (verde) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul) no sítio de implantação de fêmeas do grupo MHL no 10<sup>o</sup>ddg. Marcação com lectina DBA e DAPI mostrando células uNK DBA<sup>low</sup>, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos pouco reativos à lectina em 20x (a), 40X (d) e 100x (g). Marcação para perforina e DAPI mostrando células uNK DBA<sup>low</sup>, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos pouco reativos ao anti-perforina em 20x (b), 40X (e) e 100x (h). Sobreposição das marcações de lectina DBA e perforina, as cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>low</sup> com grânulos pouco reativos à lectina e ao anti-perforina em 20x (c), 40X (f) e 100x (i).

#### 5.4.2 Imunofluorescência para caspase-3 clivada

Foi realizada, também, a imunofluorescência para caspase-3 clivada nos SI de 10<sup>o</sup>ddg de mães RC e HL (FIGURA 15). Como apresentado na Figura 15a, foi possível observar poucas células positivas à caspase-3 clivada na região de decídua do grupo MRC e que algumas dessas células eram positivas

também à lectina DBA (FIGURA 15e). Já nos sítios de implantação de fêmeas do grupo MHL foi constatada maior frequência de células positivas para caspase-3 clivada (FIGURA 15b) em relação às fêmeas do grupo MRC (FIGURA 15a), o que indica maior incidência de morte celular por apoptose nos SI de mães que consumiram a dieta rica em gordura. A dupla marcação revelou que entre as células positivas para caspase-3 clivada haviam muitas células uNK DBA<sup>+</sup> (FIGURA 15f).

Figura 15- Análise imunofluorescência para caspase-3 clivada no sítio de implantação de fêmeas MRC e MHL no 10ºddg.



Fonte: Do autor

Nota: Imunofluorescência com dupla marcação para caspase-3 clivada (verde) e perforina (vermelho) com núcleos celulares marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul). Células da decídua de MRC com marcação positiva para caspase-3 clivada (a), lectina DBA (c) e sobreposição das imagens mostrando células uNK e células positivas para caspase-3 clivada (e). Células da decídua de MHL com marcação positiva para caspase-3 clivada (b), lectina DBA (d) e sobreposição das imagens mostrando células uNK e células positivas para caspase-3 clivada (f). As setas apontam para células positivas para caspase-3 clivada e as cabeças de setas para células positivas para lectina DBA e caspase-3 clivada. Aumento microscópico de 40x.

## 5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão gênica mostrou que há alteração na expressão de diversas moléculas presentes na decídua materna devido ao consumo da dieta hiperlipídica durante a gestação.

Foi avaliada a expressão de perforina, importante componente do conteúdo granular das células uNK., foi observado que o consumo de dieta HL ao longo da gestação foi capaz de interferir na expressão de perforina pelas células uNK na decídua. Como podemos observar na figura 16a, o consumo de dieta HL não alterou a expressão desta molécula no 6° ( $p > 0,9999$ ) e 10°ddg ( $p = 0,9394$ ) no grupo MHL, quando comparado aos mesmos dias de gestação do grupo controle. Já no 14°ddg foi observado um aumento significativo na expressão de perforina no grupo MHL ( $p = 0,0004$ ).

Resultado semelhante foi observado para a expressão de granzima B (FIGURA 16b), outro importante componente do conteúdo granular das células uNK, o qual teve sua expressão alterada devido ao consumo de dieta ao longo da gestação. Assim como os resultados obtidos para perforina, não foi observada alteração na expressão esta molécula no 6°ddg ( $p > 0,9999$ ) e 10°ddg ( $p = 0,9711$ ) do grupo MHL em relação a MRC. Entretanto, a expressão de granzima B foi maior no grupo MHL no 14°ddg ( $p = 0,0013$ ).

Também foi analisada a expressão dos receptores de inibição da atividade das células uNK, Ly49A e B. De acordo com a análise estatística o grupo MHL reduziu a expressão de receptores Ly49A no 6°ddg em relação ao grupo controle ( $p = 0,0004$ ). Já com relação ao 10°ddg não foi observada diferença entre os grupos ( $p > 0,9999$ ) e o mesmo ocorreu no 14°ddg ( $p = 0,7671$ ) (FIGURA 16c).

Diferente do receptor Ly49A, a expressão de Ly49B (FIGURA 16d) parece não ter sido afetada pelo consumo da dieta hiperlipídica ao longo da gestação. A análise estatística mostrou que o consumo de dieta HL não alterou a expressão deste receptor no grupo MHL em comparação ao grupo MRC ( $p = 0,6270$ ) no 6°ddg, o mesmo ocorreu no 10°ddg ( $p > 0,9999$ ) e no 14°ddg ( $p = 0,9040$ ).

A análise de PCR quantitativo da expressão de IFN $\gamma$  (Interferon gama) (FIGURA 16e) mostrou que a dieta promoveu redução na expressão desta

molécula no início da gestação. A comparação entre o grupo MRC e MHL no 6ºddg mostrou redução significativa ( $p= 0,0025$ ) na expressão de IFN $\gamma$  neste dia de gestação. Já no 10ºddg não houve diferença significativa ( $p>0,9999$ ) entre os grupos e o mesmo ocorreu no 14ºddg, no qual também não foram observadas diferenças significativas ( $p= 0,8869$ ).

Foi analisada ainda a expressão de VEGF $\alpha$  (fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$ ) (FIGURA 16f), o qual mostrou ter sua expressão alterada devido ao consumo da dieta HL. Embora não tenha sido observada diferença significativa na expressão de VEGF $\alpha$  entre MRC e MHL no 6ºddg ( $p= 0,5954$ ) e 10ºddg, a expressão desta molécula no 14ºddg encontrava-se reduzida no grupo MHL ( $p= 0,0300$ ).

Com relação a expressão de TNF $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ) (FIGURA 16g) o consumo da dieta ao longo do tempo promoveu alteração de sua expressão. De acordo com os resultados não foram observadas alterações na expressão de TNF $\alpha$  na decídua de fêmeas MHL no 6ºddg ( $p= 0,9668$ ) e no 10ºddg ( $p= 0,9936$ ), entretanto, no 14ºddg ocorreu redução na expressão deste sinalizador celular no grupo MHL em relação ao grupo MRC ( $p= 0,0316$ ).

Assim como o receptor Ly49B, a expressão do receptor TLR4 não sofreu alteração ao longo da prenhez devido ao consumo de dieta HL. Os resultados mostraram que a expressão deste receptor no 6º ( $p= 0,8769$ ), 10º ( $p>0,9999$ ) e 14ºddg foram estatisticamente semelhantes (FIGURA 16h).

Já a análise da expressão de IL-1 $\beta$  (interleucina-1 $\beta$ ) (FIGURA 16i) mostrou que o consumo da dieta HL promoveu diminuição da expressão desta molécula no 6ºddg em fêmeas MHL. O mesmo não foi constatado no 10ºddg ( $p >0,9999$ ) e 14ºddg ( $p= 0,4762$ ).

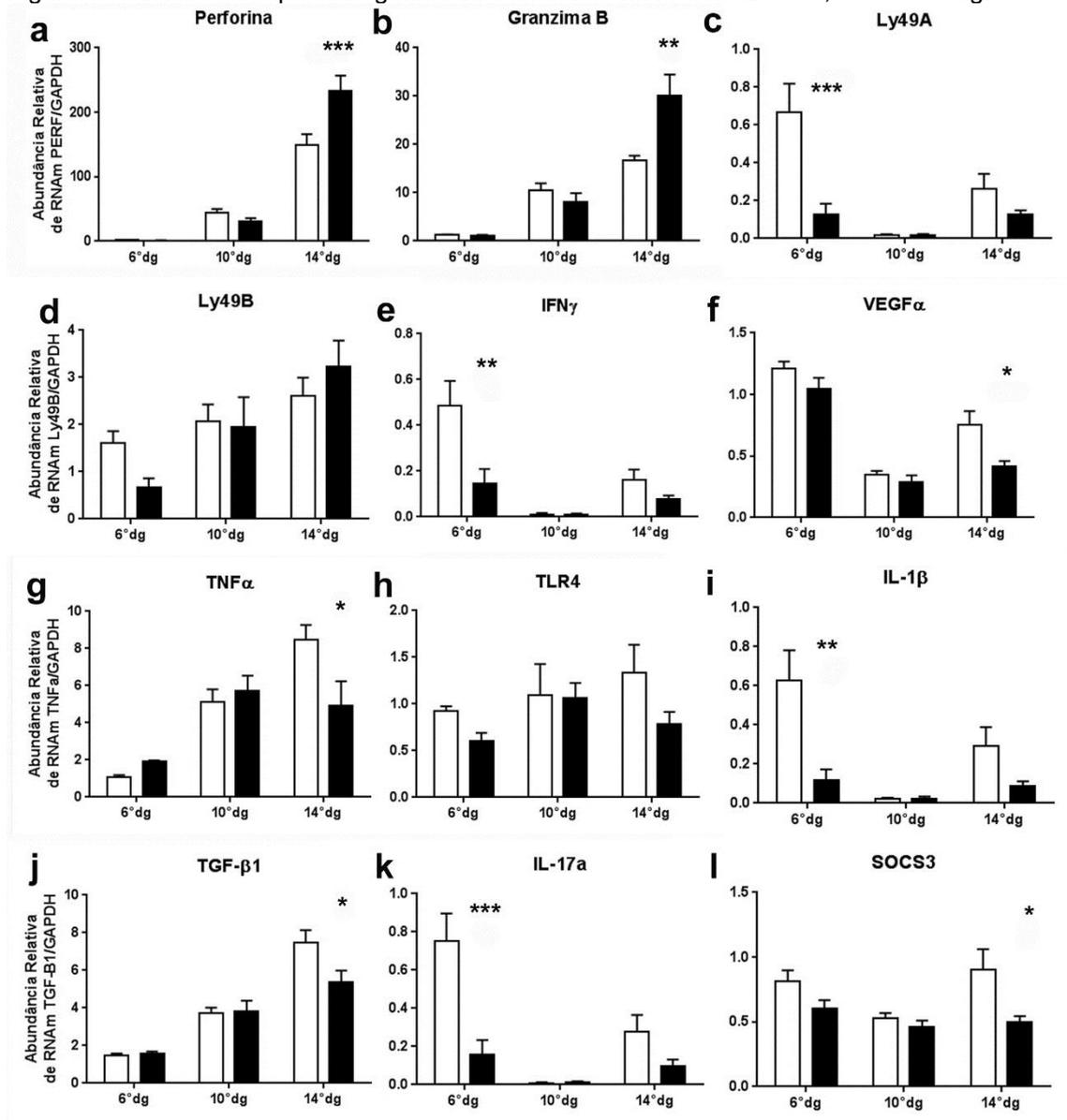
Ao ser analisada a expressão de TGF- $\beta$ 1 (Fator de transformação do crescimento- $\beta$ 1) (Figura 16j) foi constatado que o consumo da dieta HL ao longo do tempo promoveu redução da expressão desta molécula na decídua de fêmeas MHL. Embora a expressão de TGF- $\beta$ 1 não tenha sofrido alteração no 6ºddg ( $p >0,9999$ ) e 10ºddg ( $p >0,9999$ ), no 14ºddg a quantidade de RNAm de TGF- $\beta$ 1 no grupo MHL era significativamente menor que a observada em fêmeas do grupo MRC ( $p= 0,0413$ ).

Diferentemente do que foi observado para o TGF- $\beta$ 1 (FIGURA 16k), a expressão de IL-17a mostrou-se significativamente menor em fêmeas MHL no

6°ddg ( $p= 0,0002$ ), mas não encontrava-se alterada no 10°ddg ( $p>0,9999$ ) e 14°ddg em relação ao que foi observado no grupo MRC ( $p= 0,5596$ ).

Por último, foi averiguada a expressão de SOCS3 (Supressor da sinalização de citocinas 3) (FIGURA 16I), a análise estatística que a expressão desta molécula foi estatisticamente similar entre os grupos MRC e MHL no 6° ( $p= 0,4827$ ) e 10°ddg ( $p= 0,9925$ ), entretanto, no 14°ddg houve redução da expressão de SOCS3 no grupo MHL quando comparado com grupo MRC ( $p= 0,0217$ ).

Figura 16- Análise da expressão gênica da decídua de MRC e MHL no 6°, 10° e 14°dg.



Fonte: Do autor

Nota: Análise da expressão gênica da decídua de MRC e MHL no 6°, 10° e 14°dg. Foi analisada a expressão de Perforina (a), Granzima B (b), Ly49A (c), Ly49B (d), Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (e), Fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (Vegfa) (f), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (g), *Toll like receptor* 4 (TLR4) (h), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (i), Fator transformador de crescimento-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (j), Interleucina-17a (IL-17a) (k), Supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3) (l). \*(p<0,05), \*\*\*(p<0,01), \*\*\*p<0,001. Testes estatísticos utilizado para análise foram ANOVA 2 vias e teste de Tukey para comparações múltiplas.

Os dados referentes aos valores de F e p da análise de ANOVA 2 vias encontram-se descritos abaixo na tabela 10.

Tabela 10- Valores de F e p para a análise de expressão gênica.

	F (DFn, DFd)			Valor de P		
	Interação	Tempo	Dieta	Interação	Tempo	Dieta
Perforina	F <sub>(2,23)</sub> = 11	F <sub>(2,23)</sub> = 162,1	F <sub>(1,23)</sub> = 6,583	P=0,0004	P<0,0001	P=0,0173
Granzima B	F <sub>(2,24)</sub> = 8,665	F <sub>(2,24)</sub> = 59,76	F <sub>(1,24)</sub> = 4,915	P=0,0015	P<0,0001	P=0,0363
Ly49A	F <sub>(2,24)</sub> = 7,134	F <sub>(2,24)</sub> = 13,44	F <sub>(1,24)</sub> = 14,04	P=0,0037	P=0,0001	P=0,0010
Ly49B	F <sub>(2,24)</sub> = 1,685	F <sub>(2,24)</sub> = 8,906	F <sub>(1,24)</sub> = 0,1726	P=0,2067	P=0,0013	P=0,6815
IFN $\gamma$	F <sub>(2,24)</sub> = 5,136	F <sub>(2,24)</sub> = 15,53	F <sub>(1,24)</sub> = 9,999	P=0,0139	P<0,0001	P=0,0042
VEGF $\alpha$	F <sub>(2,24)</sub> = 1,914	F <sub>(2,24)</sub> = 67,41	F <sub>(1,24)</sub> = 10,18	P=0,1693	P<0,0001	P=0,0039
TNF $\alpha$	F <sub>(2,24)</sub> = 5,263	F <sub>(2,24)</sub> = 25,66	F <sub>(1,24)</sub> = 1,29	P=0,0127	P<0,0001	P=0,2672
TLR4	F <sub>(2,24)</sub> = 0,8414	F <sub>(2,24)</sub> = 1,493	F <sub>(1,24)</sub> = 3,254	P=0,4434	P=0,2448	P=0,0838
IL-1 $\beta$	F <sub>(2,24)</sub> = 5,184	F <sub>(2,24)</sub> = 9,625	F <sub>(1,24)</sub> = 13,38	P=0,0134	P=0,0009	P=0,0012
TGF- $\beta$ 1	F <sub>(2,22)</sub> = 3,993	F <sub>(2,22)</sub> = 62,52	F <sub>(1,22)</sub> = 3,301	P=0,0332	P<0,0001	P=0,0829
IL-17a	F <sub>(2,24)</sub> = 7,987	F <sub>(2,24)</sub> = 16,98	F <sub>(1,24)</sub> = 17,11	P=0,0022	P<0,0001	P=0,0004
SOCS3	F <sub>(2,24)</sub> = 2,123	F <sub>(2,24)</sub> = 4,332	F <sub>(1,24)</sub> = 11,34	P=0,1416	P=0,0248	P=0,0026

Fonte: Do autor.

Nota: Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (Vegf $\alpha$ ), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), *Toll like receptor 4* (TLR4), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator transformador de crescimento-  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Interleucina-17a (IL-17a), Supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3). F: grau de liberdade; p: significância.

## 5.6 ANÁLISE DAS CÉLULAS ILCS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Parte deste estudo foi desenvolvido no laboratório do Dr. Babak Baban na Universidade de Augusta, nos Estados Unidos. Por meio da técnica de citometria de fluxo foram quantificadas Células Linfóides Inatas (ILCs- *Innate Lymphoid Cells*) e alguns de seus sinalizadores após o consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação.

Os resultados (FIGURA 17) mostraram que não foram encontradas diferenças significativas na porcentagem deste tipo celular entre os grupos MRC e MHL no 6<sup>o</sup>ddg (p= 0,9817), no 10<sup>o</sup>ddg (p= 0,9867) e 14<sup>o</sup>ddg (p= 0,8577), entretanto foi observado aumento significativo de células uILC na decídua materna de fêmeas MHL no 14<sup>o</sup>ddg em relação a fêmeas MRC no 6<sup>o</sup>ddg (p= 0,0188) (FIGURA 17a).

A quantidade de células T também não se alterou devido o consumo de dieta HL, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos MRC e MHL nos 3 dias de gestação analisados (6°ddg- 0,7193; 10°ddg- p= 0,9026; 14°ddg- p= 0,8380) (FIGURA 17b).

Foi analisada também a presença deIDO (indolamina 2,3-dioxigenase), molécula relacionada a atividade do sistema imune. Foi constatado que as fêmeas do grupo MHL do 6° (p= 0,6465), 10° (p= 0,9907) e 14°ddg (p= 0,8989) não sofreram alteração quanto a quantidade deIDO presente na decídua em relação ao grupo controle (FIGURA 17c). Também não foi constatada alteração na quantidade de células uILC positivas para aIDO indicando que a dieta não promove aumento da síntese desta proteína pelas células ILC presentes no útero prenhe (6°ddg- p= 0,9997; 10°ddg- p= 0,9574; 14°ddg- p= 0,9989) (FIGURA 17d).

Outra molécula analisada foi a interleucina-10 (IL-10) a qual, assim como aIDO, está envolvida com a atividade e resposta de células imunológicas e está presente no útero durante a gestação. De acordo com a análise estatística, embora tenha ocorrido diminuição significativa desta interleucina entre o 6° e 14°ddg em fêmeas MHL (p= 0.0386), não houve diferença significativa na quantidade de IL-10 entre os grupos MRC e MHL no 6° (p=0.9999), 10° (p= 0,9310) e 14°ddg (p= 0,9960) (FIGURA 17e). Ao contrário da diminuição de IL-10 observada na decídua de fêmeas MHL, entre o 6° e 14°ddg a quantidade de células uILC positivas para IL-10 parecem aumentar com o decorrer do processo gestacional, entretanto, este aumento não foi estatisticamente significativo. A quantidade de células ILC<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> não mostrou diferença estatística entre os grupos MRC e MHL (6°ddg- p= 0,7754; 10°ddg- p= 0,4881; 14°ddg- p= 0,9994) (FIGURA 17f).

A análise da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato fosforilada (pAMPK) parece reduzir com o decorrer do processo gestacional, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas significativas. A quantidade de pAPMK não se alterou devido ao consumo de dieta HL, uma vez que não houve aumento ou redução desta proteína quando comparados os grupos MRC e MHL no 6° (p= 0,9994), 10° (p= 0,9985) e 14°ddg (p >0,9999) (FIGURA 17g).

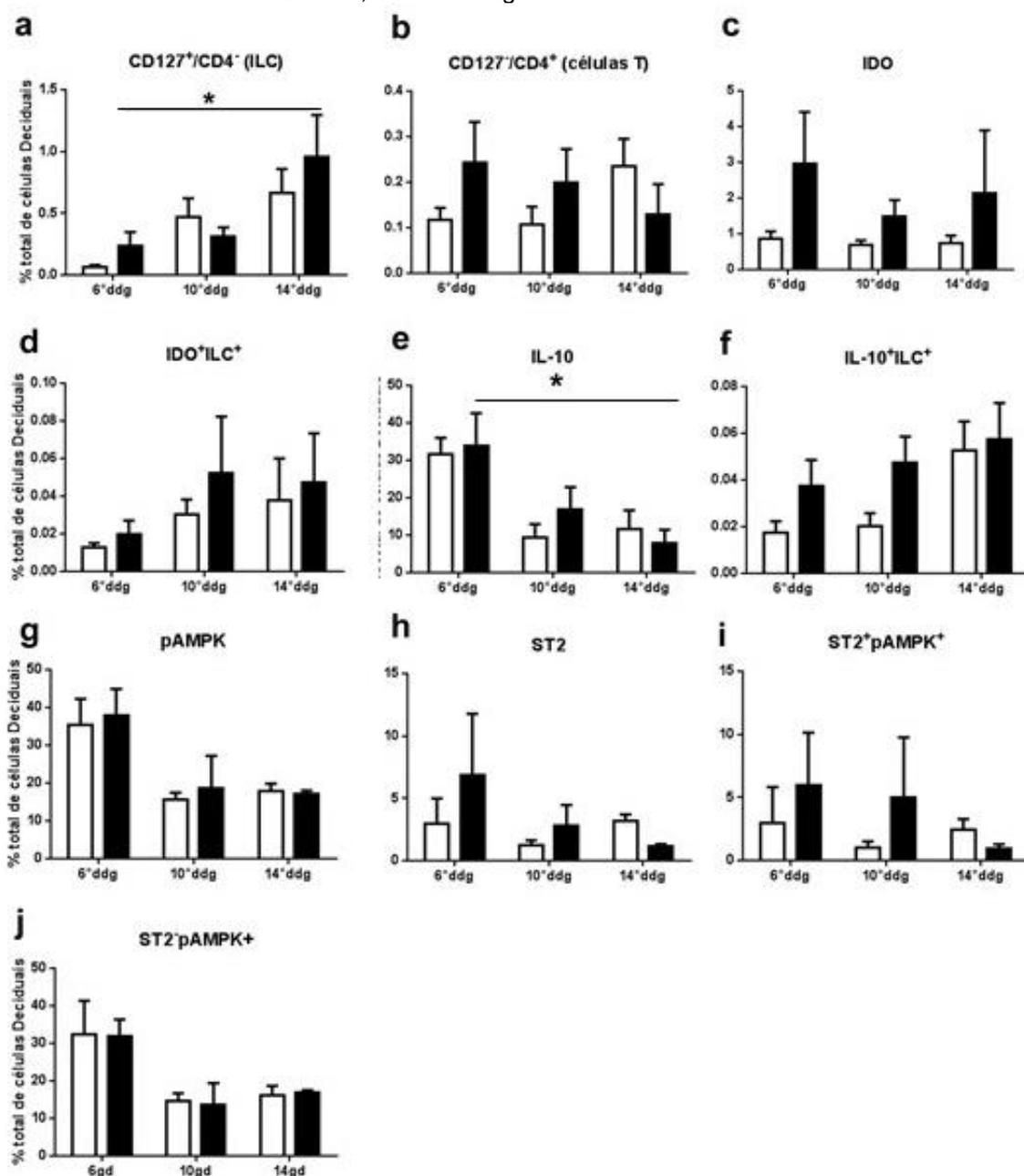
Foi analisada também a quantidade do receptor ST2, entretanto não foi

observada interferência significativa assim entre MRC e MHL ou entre os grupos durante a gestação (6°ddg-  $p= 0,8301$ ; 10°ddg-  $p= 0,9958$ ; 14°ddg-  $p= 0,9883$ ) (FIGURA 17h).

Além da análise da quantidade de células positivas para o receptor ST2 e para pAMPK, foi analisada a quantidade de células que apresentavam o receptor ST2 e eram positivas para pAMPK. Os resultados mostraram que a dieta não alterou a quantidade de células que eram ST2<sup>+</sup>/pAMPK<sup>+</sup> em MHL em relação a MRC (6°ddg-  $p= 0,9792$ ; 10°ddg-  $p= 0,9086$ ; 14°ddg-  $p= 0,9988$ ) (FIGURA 17i). O mesmo ocorreu com a quantidade de células ST2<sup>-</sup>/pAMPK<sup>+</sup> (6°ddg-  $p>0,9999$ ; 10°ddg-  $p>0,9999$ ; 14°ddg-  $p>0,9999$ ), embora pareça ocorrer uma diminuição na quantidade destas células durante a prenhez (FIGURA 17j).

Os valores de F e p encontrados na análise estatística encontram-se disponíveis na tabela 9, abaixo. Com relação aos valores exatos de média e desvio, estes encontram-se disponíveis no anexo a (tabelas 19 a 28).

Figura 17- Análise por citometria de fluxo das células uILC no sítio de implantação de fêmeas ICR MRC e MHL no 6°, 10° e 14°ddg.



Fonte: Do autor.

Nota: Análise de citometria de fluxo das Células Linfoides Inatas uterinas (uILC). Porcentagem de células ILC (a), porcentagem de células T (b), porcentagem de células decíduais positivas Indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) (c), porcentagem de células ILC positivas para IDO (d), porcentagem de células positivas para Interleucina-10 (IL-10) (e), porcentagem de células ILC positivas para IL-10 (f), porcentagem de células positivas para Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato fosforilada (pAMPK) (g), porcentagem de células positivas para ST2 (h), porcentagem de células positivas para ST2 e para pAMPK (i), porcentagem de células decíduais positivas para pAMPK (j). \*( $p < 0,05$ ). Os testes utilizados para análise foram ANOVA 2 vias e teste Tukey para comparações múltiplas.

Tabela 11- Valores de F e p para a análise de citometria de fluxo dos grupos MRC e MHL.

	F (DFn, DFd)			Valor de P		
	Interação	Tempo	Dieta	Interação	Tempo	Dieta
CD127+/CD4- (ILC)	F <sub>(2,24)</sub> = 0,8588	F <sub>(2,24)</sub> = 6,994	F <sub>(1,24)</sub> = 0,4737	P=0,4363	P=0,0040	P=0,4979
CD127-/CD4+ (Tcells)	F <sub>(2,24)</sub> = 1,973	F <sub>(2,24)</sub> = 0,143	F <sub>(1,24)</sub> = 0,5256	P=0,1609	P=0,8675	P=0,4755
IDO <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,2263	F <sub>(2,18)</sub> = 0,3742	F <sub>(1,18)</sub> = 3,33	P=0,7997	P=0,6931	P=0,0847
IDO+ILC <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,0884	F <sub>(2,18)</sub> = 1,201	F <sub>(1,18)</sub> = 0,73	P=0,9158	P=0,3240	P=0,4041
IL-10 <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,5101	F <sub>(2,18)</sub> = 9,977	F <sub>(1,18)</sub> = 0,1756	P=0,6088	P=0,0012	P=0,6802
ILC <sup>+</sup> /IL-10 <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,5642	F <sub>(2,18)</sub> = 3,573	F <sub>(1,18)</sub> = 3,949	P=0,5786	P=0,0493	P=0,0623
pAMPK <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,07153	F <sub>(2,18)</sub> = 8,356	F <sub>(1,18)</sub> = 0,1294	P=0,9312	P=0,0027	P=0,7233
ST2 <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,8406	F <sub>(2,18)</sub> = 1,037	F <sub>(1,18)</sub> = 0,3888	P=0,4477	P=0,3749	P=0,5407
ST2 <sup>+</sup> pAMPK <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,6363	F <sub>(2,18)</sub> = 0,3917	F <sub>(1,18)</sub> = 0,8539	P=0,5408	P=0,6815	P=0,3677
ST2 <sup>+</sup> pAMPK <sup>+</sup>	F <sub>(2,18)</sub> = 0,01417	F <sub>(2,18)</sub> = 8,007	F <sub>(1,18)</sub> = 0,005	P=0,9859	P=0,0033	P=0,9442

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os valores de F (grau de variação amostral) e P (significância) para a análise de ANOVA 2 vias da análise de citometria de fluxo dos grupos MRC e MHL.

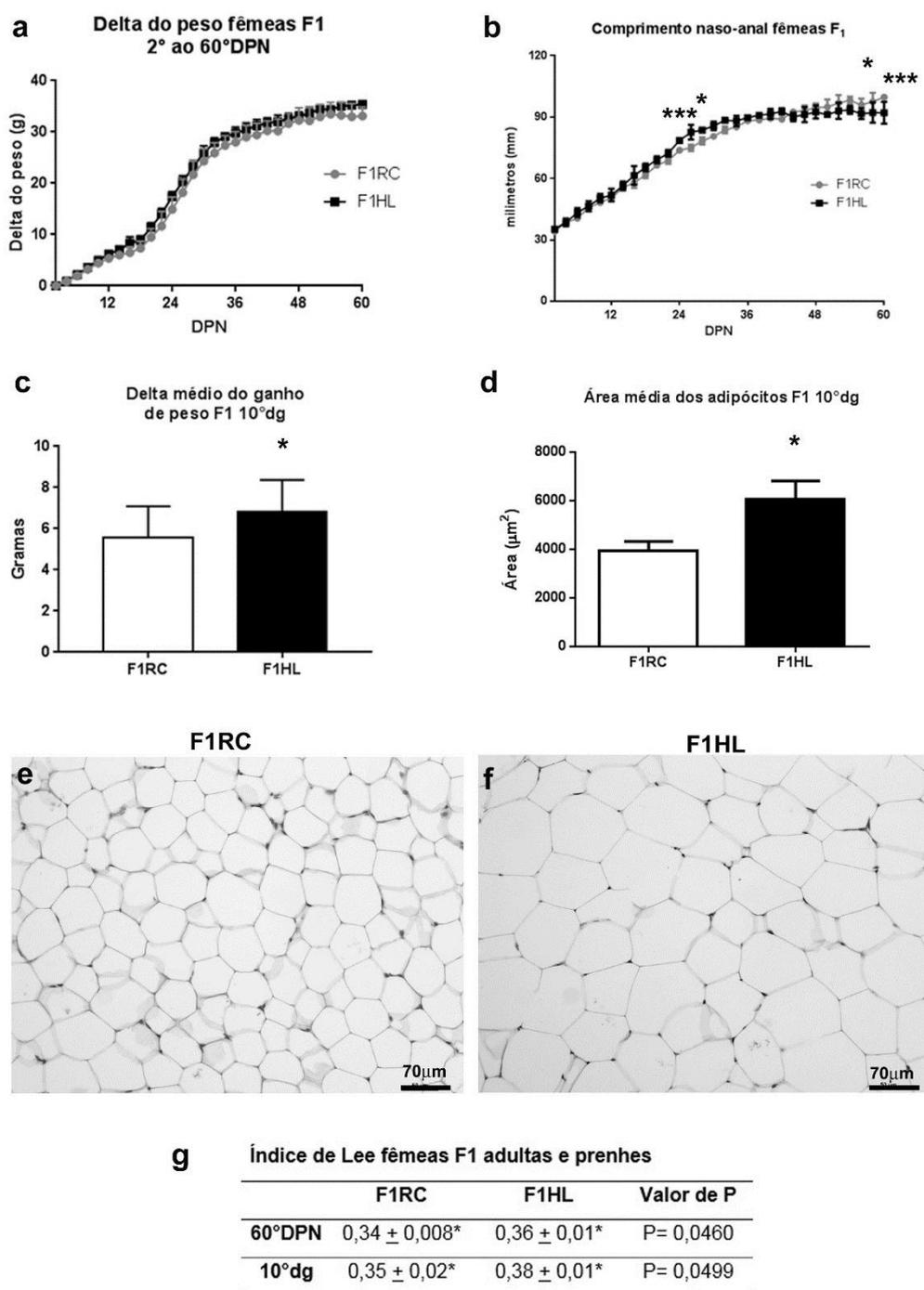
## 5.7. ANÁLISE DO GANHO DE PESO DA PROLE

Não foram observadas alterações em relação ao ganho de peso da prole do 2° ao 60° dia pós-natal (DPN) (FIGURA 18a e TABELA 12). Já com relação ao comprimento naso-anal da prole (FIGURA 18b e TABELA 12), foi observada diferença significativa na média do comprimento naso-anal entre os grupos no 26°, 28°, 58° e 60°DPN. No 26°DPN a média do comprimento naso-anal do grupo F1HL ( $82,6 \pm 3,6$ mm) foi maior do que o no grupo F1RC ( $74,9 \pm 1,52$ mm) ( $p= 0,0002$ ). O mesmo ocorreu no 28°DPN onde o comprimento naso-anal médio de grupo F1HL foi de  $83,70$ mm ( $\pm 0,52$ ) e o grupo F1RC apresentou média de  $78,35$ mm ( $\pm 1,73$ ) ( $p= 0,0399$ ). Já no 58°DPN houve queda do comprimento naso-anal de F1HL ( $92,3 \pm 5$ mm) em relação ao grupo controle ( $97,6 \pm 4,46$ mm) ( $p= 0,0432$ ). Semelhante ao ocorrido no 58°DPN, no 60°DPN a média do grupo F1HL ( $92,11 \pm 5,31$ mm) era menor do que no grupo F1RC ( $99,74 \pm 1,10$ mm) ( $p= 0,0002$ ).

A análise do ganho de peso da prole prenhe (FIGURA 18c) mostrou que houve diferença significativa entre o ganho de peso do grupo F1HL ( $6,83 \pm 1,54\text{g}$ ) em relação ao ganho de peso de F1RC ( $5,56 \pm 1,52\text{g}$ ) no 10ºddg ( $p= 0,0150$ ). Este resultado mostra que as fêmeas, filhas de mães que consumiram dieta hiperlipídica durante a prenhez, ganham mais peso durante a gestação em ao grupo controle. Tal resultado é corroborado pela comparação entre a área média do tecido adiposo dos grupos F1RC e F1HL no 10ºddg (FIGURA 18d), na qual podemos observar que o grupo F1HL ( $6063 \pm 1685\mu\text{m}^2$ ) apresentou um aumento significativo da área durante a gestação em relação ao grupo F1RC ( $3936 \pm 872,9\mu\text{m}^2$ ) ( $p= 0,0366$ ). As Figuras 18e e f mostram micrografia de luz nas quais pode-se observar a diferença da área dos adipócitos entre os dois grupos.

Por meio do cálculo do Índice de Lee foi possível constatar que as fêmeas do grupo F1HL possuíam maior adiposidade que o grupo controle já no 60ºDPN, antes de estarem prenhes (FIGURA 18g). Este estado se manteve durante a gestação, uma vez que a prole F1HL obteve um Índice de Lee maior em relação ao grupo controle no 10ºddg.

Figura 18- Análise do ganho de peso da geração F1 virgem e prenhe.



Fonte: Do autor

Nota: Análise do ganho de peso da geração F1 virgem e prenhe. Delta do peso das fêmeas de proles dos grupos MRC e MHL mostrando a variação no ganho de peso do 2° ao 60° dia pós-natal (DPN). Teste para análise foi ANOVA 2 vias e teste Bonferroni para comparações entre os dias (a). Análise do comprimento naso-anal das fêmeas F1 também do 2° ao 60°PND. Teste utilizado para análise foi ANOVA 2 vias e teste de Sidak para comparações múltiplas (b). Delta médio do ganho de peso de F1 prenhe no 10°ddg. Teste utilizado para análise foi teste t não pareado (c). Área média de células do tecido adiposo de F1 prenhe no 10°ddg. Teste utilizado na análise foi teste t não pareado (d). Fotomicrografias do tecido adiposo de F1RC (e) e F1HL (f) no 10°ddg. Análise do Índice de Lee da prole adulta no 60°PND e no 10°ddg. Teste utilizado foi teste do Qui-quadrado (g). \*(p<0,05), \*\*(p<0,01) e \*\*\*(p<0,001).

Tabela 12- Valores de F e p para a análise do ganho de peso e crescimento da prole.

	Ganho de peso F1		Comprimento naso-anal	
	F (DFn, DFd)	Valor de P	F (DFn, DFd)	Valor de P
Interação	$F_{(29,240)}= 0,3545$	$P=0,9993$	$F_{(29,180)}= 5,12$	$P<0,0001$
Tempo	$F_{(29,240)}= 533,8$	$P<0,0001$	$F_{(29,180)}= 584,2$	$P<0,0001$
Dieta	$F_{(1,240)}= 1,658$	$P=0,1991$	$F_{(1,180)}= 8,997$	$P=0,0031$

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os valores de F (grau de variação amostral) e P (significância) para a análise de ANOVA 2 vias quanto o ganho de peso e o comprimento naso-anal das proles F1RC e F1HL.

## 5.8 ANÁLISE DA VIABILIDADE GESTACIONAL DE F1

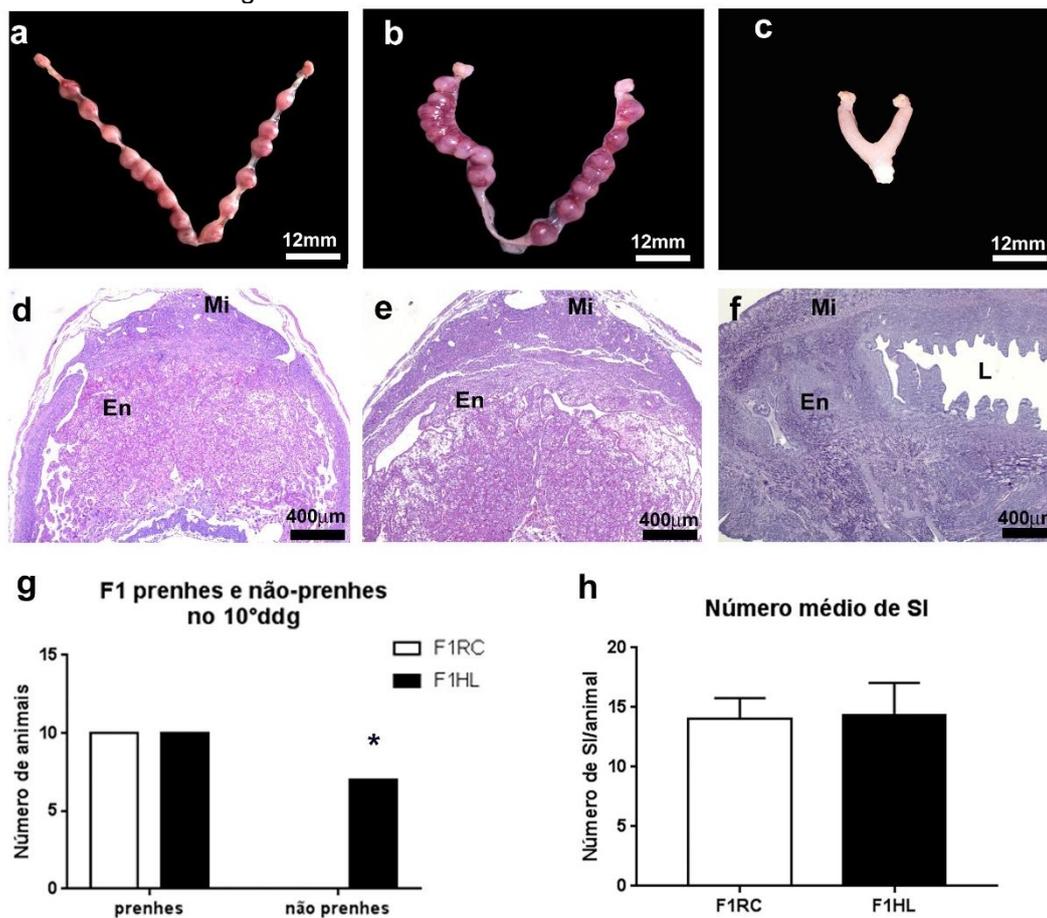
Assim como nas mães que consumiram a dieta hiperlipídica, as fêmeas da geração F1 que apresentaram o tampão vaginal após a cópula, tiveram seus úteros analisados macroscopicamente e os SI contados, para avaliação da viabilidade gestacional. Foi observada a presença ou não sítios de implantação, focos hemorrágicos e a presença de SI em reabsorção.

Como apresentado na figura 19a o útero das fêmeas do grupo F1RC apresentaram útero contendo SI de aspecto normal, como esperado. Não foram detectados focos hemorrágicos e/ou SI em reabsorção. Parte das fêmeas do grupo F1HL também apresentaram úteros característicos do 10ºddg, com morfologia semelhante a apresentada pelo grupo controle (FIGURA 19b). Entretanto, em parte das fêmeas do grupo F1HL, não foram observados SI, mesmo após ter sido detectado o tampão vaginal após a cópula (FIGURA 19d). Os cornos uterinos destes animais não tinham o mesmo aspecto observado em útero de camundongo virgem (FIGURA 19c) e, além de não apresentarem sítios de implantação, estavam menores e tinham aspecto de inchados.

A análise microscópica dos sítios de implantação dos grupos F1RC (FIGURA 19d) e F1HL (FIGURA 19e) mostrou não haver grandes diferenças morfológicas entre os SI de ambos os grupos. Já a análise morfológica do SI do útero de animais F1HL que não estavam prenhes no 10ºddg, revelou que não haviam embriões no útero destes animais ou mesmo processo de reabsorção em andamento, o epitélio uterino já estava reestabelecido e a luz uterina era visível (FIGURA 19f).

A análise estatística mostrou que a quantidade de fêmeas não-prenhes no grupo F1HL foi significativo ( $p= 0,0184$ ) (FIGURA 19g), o que indica que houve uma redução da viabilidade gestacional no grupo F1HL. Entretanto, a análise do número médio de sítios de implantação de fêmeas que apresentavam sítios após laparotomia (FIGURA 19h) mostrou que não houve diferença ( $p= 0,8161$ ) na quantidade média de SI entre o grupo F1RC (14,5 SI/Animal) e F1HL (15 SI/Animal).

Figura 19- Análise dos cornos uterinos e sítios de implantação dos grupos F1HL e F1RC no 10ºddg.



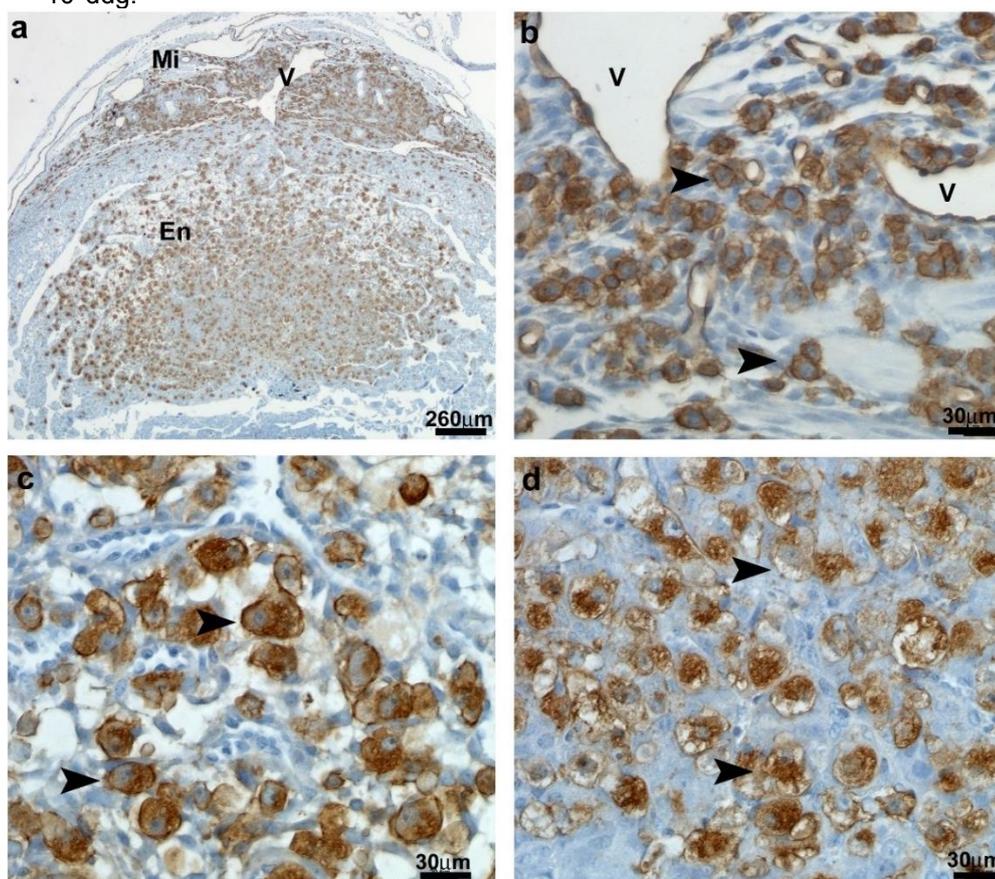
Fonte: Do autor.

Nota: Imagem macroscópica dos cornos uterinos (a) e fotomicrografia de corte transversal de SI (d) de fêmea F1RC no 10ºddg. Imagem macroscópica dos cornos uterinos (b) e fotomicrografia de corte transversal de SI (e) de fêmea F1HL no 10ºddg. Visão macroscópica de útero (c) e fotomicrografia de corte transversal do útero (f) de fêmea F1HL no 10ºddg após falha gestacional. Número médio de fêmeas prenhes e não-prenhes observadas nos grupos F1RC e F1HL (g). Número médio de SI em fêmeas F1RC e F1HL nas quais foram detectados SI. Mi- miométrio; En- endométrio; L- luz uterina.

## 5.9 ANÁLISE HISTOQUÍMICA E ESTEREOLÓGICA DAS CÉLULAS UNK DE F1

Por meio da histoquímica de lectina DBA foi possível detectar os 4 subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> nos SI da geração F1 prenhe no 10<sup>o</sup>ddg. Como apresentado na figura 20a, no SI das fêmeas F1RC foi detectada a presença de células uNK DBA<sup>+</sup> por toda a região da decídua basal. Na região 1 dos SI foram detectadas células fortemente reativas à lectina DBA e com morfologia semelhante aos subtipos I e II de células uNK (FIGURA 20b). A região 2 também apresentou grande quantidade de células com seus grânulos e membranas positivos à lectina DBA e com morfologia semelhante ao subtipo III (FIGURA 20c). O mesmo ocorreu na região 3, entretanto, a maioria das células presentes nesta região tinham morfologia semelhante ao subtipo IV (FIGURA 20d).

Figura 20- Análise histoquímica de lectina DBA no sítio de implantação do grupo F1RC no 10ºddg.



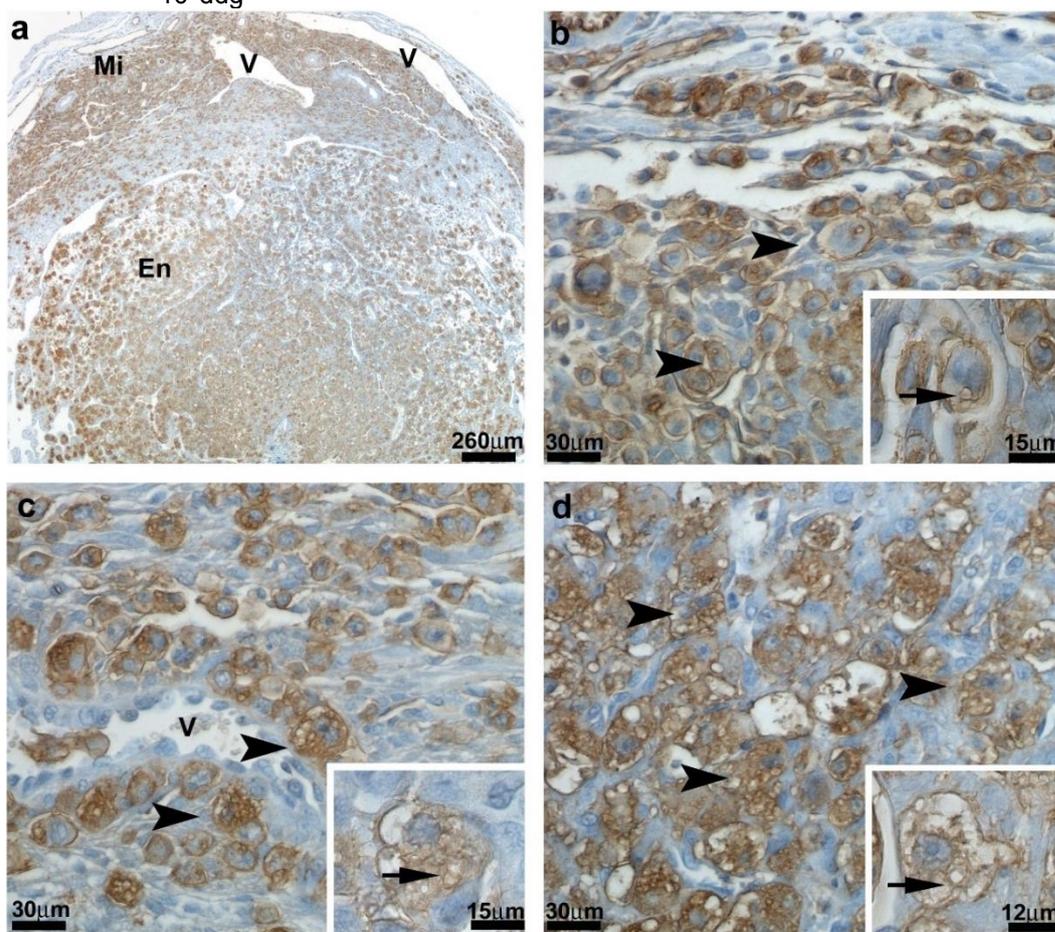
Fonte: Do autor.

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10ºddg do grupo F1RC. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 10ºddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). As cabeças de seta indicam células uNK DBA<sup>+</sup>. Mi- miométrio, En- endométrio, e V- vasos sanguíneos.

Assim como a prole F1RC prenhe apresentou os mesmos aspectos apresentados pelo grupo MRC no 10ºddg, o grupo F1HL, inesperadamente, apresentou aspectos semelhantes aos observados no grupo MHL no mesmo dia de gestação (FIGURA 21). Nas filhas prenhes de mães que consumiram dieta rica em gordura durante a gestação, foi observada a presença de células do tipo DBA<sup>low</sup>.

Na Figura 21a, podemos observar que havia grande quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> na decídua de fêmeas F1HL, entretanto, na R1 (FIGURA 21b), R2 (FIGURA 21c) e na R3 (FIGURA 21d) haviam células uNK com grânulos grandes, pouco reativos à lectina DBA e aparentemente vazios.

Figura 21- Análise histoquímica de lectina DBA no sítio de implantação do grupo F1HL no 10ºddg



Fonte: Do autor.

Nota: Fotomicrografias de citoquímica de lectina DBA no 10ºddg do grupo F1HL. Imagem panorâmica (4x) de sítio de implantação no 10ºddg (a). Região 1 (b), região 2 (c) e região 3 (d) do sítio de implantação em maior aumento (40x). Os detalhes mostram células uNK DBA<sup>low</sup> (100x). As cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>low</sup>, as setas indicam grânulos de aspecto vazio. Mi- miométrio, En- endométrio, e V- vasos sanguíneos.

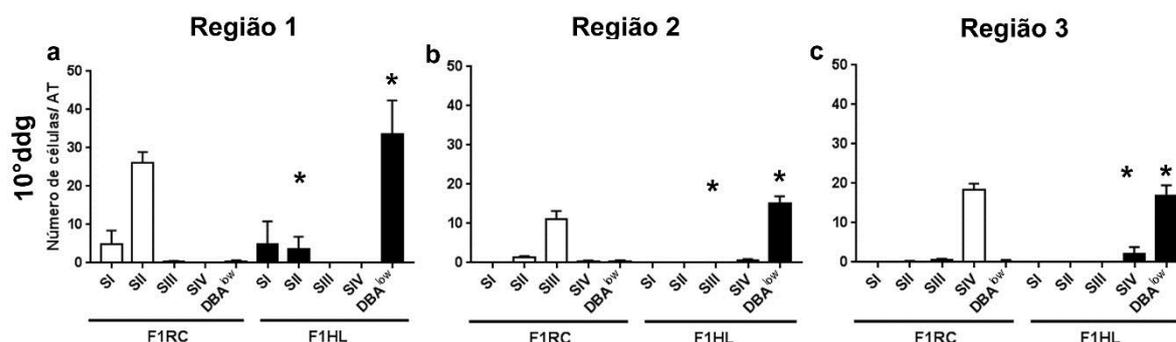
A análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> revelou que no 10ºddg há predominância de células uNK DBA<sup>+</sup> SII na R1 dos sítios de implantação do grupo MRC enquanto o grupo MHL apresentou redução na quantidade deste subtipo nesta região (FIGURA 22a) simultaneamente ao aumento significativo na quantidade de células uNK DBA<sup>low</sup>, como observado anteriormente em microscopia de luz.

Com relação a R2 foi constatado no grupo MRC grande quantidade de células SIII (FIGURA 22b) e que no grupo MHL houve redução significativa deste subtipo concomitante ao aumento de células uNK DBA<sup>low</sup>.

Na R3 assim como nas outras regiões, foi observado que o grupo MRC

apresentou um subtipo em maior quantidade que os outros, neste caso SIV (FIGURA 22c). Também como observado nas outras o grupo MHL apresentou redução na quantidade de células do subtipo com predominância na região concomitante a um aumento na quantidade de células uNK com baixa reatividade à lectina DBA, as células uNK DBA<sup>low</sup>. Comprovando o que havia sido observado em microscopia de luz. Os valores de F e p da análise estatística encontram-se na tabela 11, abaixo.

Figura 22- Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> e do subtipo DBA<sup>low</sup>.



Fonte: Do autor.

Nota: Análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> e do subtipo DBA<sup>low</sup> nos grupos F1RC e F1HL no 10° dia de gestação (dg). \* ( $p < 0,05$ ) comparação entre o mesmo subtipo de MRC e MHL. Testes estatísticos utilizados foi ANOVA 2 vias e Newman-Keuls para comparação entre os grupos.

Tabela 13- Valores de F e p para a análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>low</sup> na prole prenhe.

	F (DFn, DFd)			Valor de P		
	Interação	Subtipos	Dieta	Interação	Subtipos	Dieta
R1	F <sub>(4,40)</sub> = 68,32	F <sub>(4,40)</sub> = 44,66	F <sub>(1,40)</sub> = 3,542	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0671
R2	F <sub>(4,40)</sub> = 261,3	F <sub>(4,40)</sub> = 149,9	F <sub>(1,40)</sub> = 3,828	P<0,0001	P<0,0001	P=0,0574
R3	F <sub>(4,40)</sub> = 240,8	F <sub>(4,40)</sub> = 186,5	F <sub>(1,40)</sub> = 0,02257	P<0,0001	P<0,0001	P=0,8813

Fonte: Do autor.

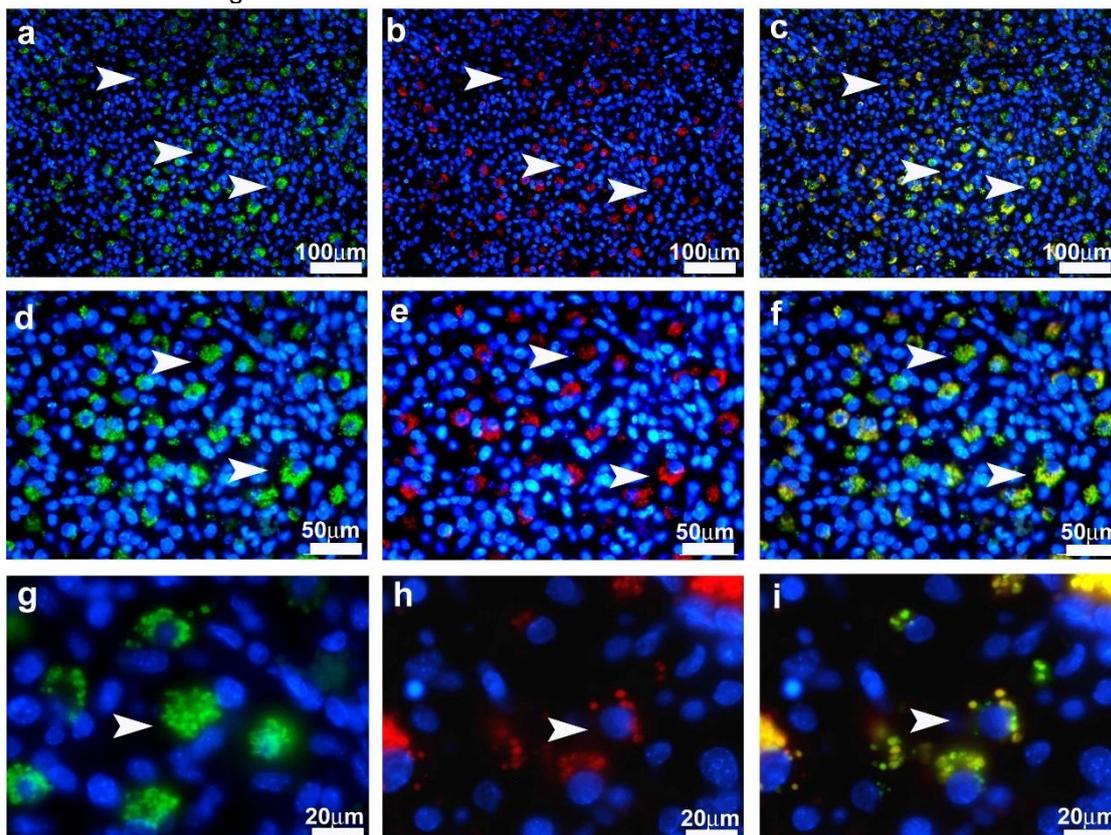
Nota: Tabela mostra os valores de F (grau de variação amostral) e P (significância) para a análise de ANOVA 2 vias quanto a análise estereológica das proles F1RC e F1HL.

## 5.10 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA NO SÍTIO DE IMPLANTAÇÃO DE FÊMEAS F1

### 5.10.1 Análise de imunofluorescência e de PCR quantitativo para perforina

Por meio da análise de imunofluorescência com dupla marcação utilizando lectina DBA e anti-perforina no 10ºddg, foi possível observar que a prole F1RC apresentava aspectos semelhantes aos presentes em mães RC no mesmo dia de gestação. Havia grande quantidade de células com grânulos fortemente reativos à lectina DBA (FIGURAS 23a, d e g) e ao anti-perforina (FIGURAS 23b, e e h) na decídua dos sítios de implantação. As figuras 23c, 23f e 23i mostram a co-localização das marcações, indicando que as células que possuíam perforina eram células uNK, como esperado. Como apresentado nas imagens, no grupo de fêmeas F1RC os grânulos das células uNK tinham aspecto de estarem cheios, não foram observados indícios de que tenha ocorrido mobilização de perforina.

Figura 23- Imunofluorescência para perforina no sítio de implantação de fêmeas F1HL no 10ºddg.

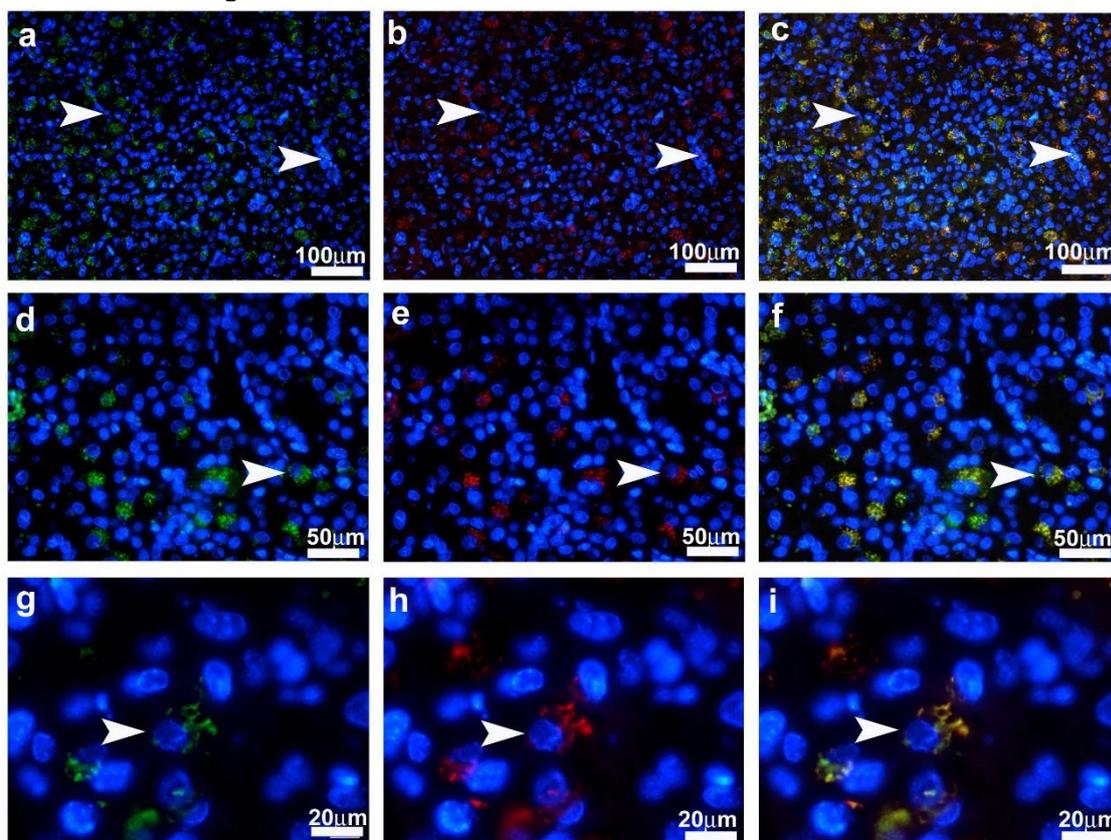


Fonte: Do autor.

Nota: Fotomicrográfas de imuno-histoquímica para perforina (vermelho) com dupla marcação para lectina DBA (verde) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul) no sítio de implantação de fêmeas do grupo MRC no 10ºddg. Marcação com lectina DBA e DAPI mostrando células uNK, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos reativos à lectina em 20x (a), 40X (d) e 100x (g). Marcação para perforina e DAPI mostrando células uNK, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos reativos ao anti-perforina em 20x (b), 40X (e) e 100x (h). Sobreposição das marcações de lectina DBA e perforina, as cabeças de setas indicam células uNK com grânulos reativos à lectina e ao anti-perforina em 20x (c), 40X (f) e 100x (i).

A análise da presença de perforina nos SI de fêmeas F1HL mostrou alteração na marcação ao anti-perforina (FIGURAS 24b, e e h). Como descrito anteriormente, no grupo F1HL também foi observada alteração na reatividade dos grânulos das células uNK à lectina DBA (FIGURAS 24a, d e g). A co-localização (FIGURAS 24c, f e i) das alterações indicam que possa ter ocorrido mobilização de perforina dos grânulos das células uNK, assim como observado nas fêmeas MHL que foram submetidas à dieta hiperlipídica.

Figura 24- Imunofluorescência para perforina no sítio de implantação de fêmeas F1HL no 10<sup>o</sup>ddg.

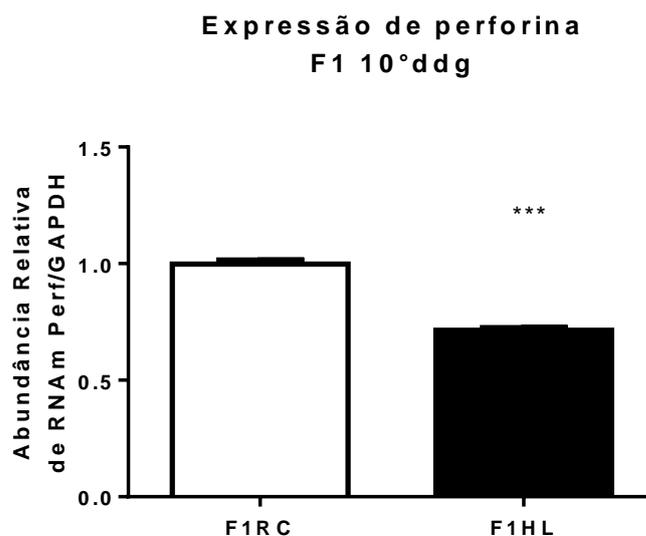


Fonte: Do autor.

Nota: Fotomicrográfas de imuno-histoquímica para perforina (vermelho) com dupla marcação para lectina DBA (verde) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul) no sítio de implantação de fêmeas do grupo F1HL no 10<sup>o</sup>ddg. Marcação com lectina DBA e DAPI mostrando células uNK DBA<sup>low</sup>, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos pouco reativos à lectina em 20x (a), 40X (d) e 100x (g). Marcação para perforina e DAPI mostrando células uNK DBA<sup>low</sup>, indicadas pelas cabeças de setas, com grânulos pouco reativos ao anti-perforina em 20x (b), 40X (e) e 100x (h). Sobreposição das marcações de lectina DBA e perforina, as cabeças de setas indicam células uNK DBA<sup>low</sup> com grânulos pouco reativos à lectina e ao anti-perforina em 20x (c), 40X (f) e 100x (i).

Foi realizada também a análise de PCR quantitativo em tempo real para analisar a expressão de perforina (FIGURA 25) pelas células uNK presentes na decídua no 10<sup>o</sup>ddg. Os resultados mostram que houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na quantidade de RNA mensageiro para perforina na decídua dos SI do grupo F1HL em comparação a expressão presente no grupo F1RC.

Figura 25- Análise da expressão gênica para perforina em fêmeas F1RC e F1HL no 10ºddg.



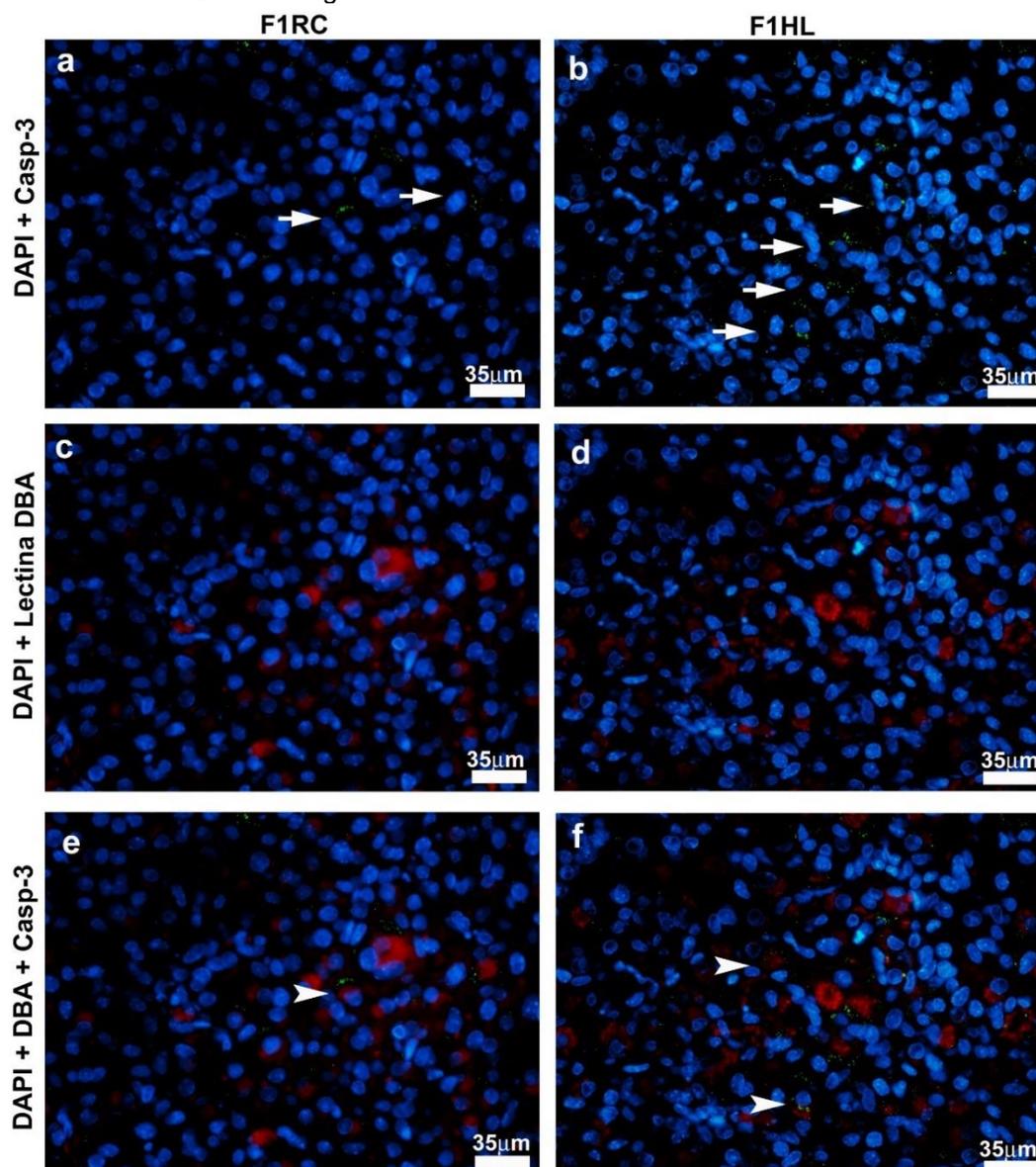
Fonte: Do autor.

Nota: Análise da expressão de perforina nos grupos F1RC e F1HL no 10ºddg. Os gráficos trazem a barra de erro padrão. \*\*\*( $p < 0,001$ ). Teste estatístico utilizado na análise foi o teste t não-pareado.

### 5.10.2 Análise Imuno-histoquímica para caspase-3 clivada

A imuno-histoquímica para caspase-3 clivada mostrou a presença de células reativas para esta proteína na decídua do grupo F1RC (FIGURA 26a), entretanto, a quantidade de células era bem reduzida. Foi observado, também, que entre as células positivas haviam células uNK DBA<sup>+</sup> (FIGURA 26e). Já na decídua do grupo F1HL foi observada maior reatividade à caspase-3 clivada (FIGURA 26b) em relação ao grupo controle. Neste grupo, também foi constatada a presença de células uNK DBA<sup>+</sup> que apresentavam reatividade à caspase-3 no citoplasma (FIGURA 26f). Este resultado indica que há aumento na quantidade de células em processo de morte celular por apoptose no endométrio de fêmeas F1HL em relação ao grupo controle e que parte dessas células são células *Natural Killer* uterinas.

Figura 26- Imunofluorescência para caspase-3 clivada no sítio de implantação de fêmeas F1RC e F1HL no 10º ddg.



Fonte: Do autor.

Nota: Imunofluorescência com dupla marcação para caspase-3 clivada (verde) e perforina (vermelho) com núcleos celulares marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (azul). Células da decídua de F1RC com marcação positiva para caspase-3 clivada (a), lectina DBA (c) e sobreposição das imagens mostrando células uNK e células positivas para caspase-3 clivada (e). Células da decídua de F1HL com marcação positiva para caspase-3 clivada (b), lectina DBA (d) e sobreposição das imagens mostrando células uNK e células positivas para caspase-3 clivada (f). As setas apontam para células positivas para caspase-3 clivada e as cabeças de setas para células positivas para lectina DBA e caspase-3 clivada. Aumento microscópico de 40x.

## 6 DISCUSSÃO

A análise do peso das mães mostrou que o grupo que consumiu dieta rica em lipídeos ganhou mais peso com o decorrer da gestação em relação ao grupo controle, bem como apresentou maior área média de tecido adiposo. Tais resultados corroboram com dados já descritos na literatura que mostram que o consumo de dieta rica em lipídeos induz o ganho de peso e, a longo prazo, à obesidade (MORAES et al., 2009; SALLES, 2014; GIMPFL et al., 2017).

Embora as mães tenham ganhado peso durante a gestação, isso parece não ter influenciado no peso de suas filhas, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas no peso da prole no 2ºDPN. O mesmo já foi descrito por Frias e colaboradores (2011), onde o peso da prole de mães que consumiram dieta indutora de obesidade não diferiu do peso de filhotes nascidos de mães controles.

Apesar de a prole HL não ter apresentado alteração com relação ao peso do nascimento até o 60ºDPN, ao atingir a vida adulta, seu Índice de Lee era maior do que o observado no grupo controle, pois seu crescimento parece ter sido prejudicado. Uma vez que o Índice de Lee é utilizado para a análise da massa corporal e atua como preditor do excesso de peso, pode-se dizer que a prole HL apresentou maior susceptibilidade à obesidade.

A análise do peso da prole prenhe mostrou que as fêmeas F1HL ganharam mais peso em relação às prenhes do grupo F1RC até o 10ºddg. Embora não haja estudos na literatura sobre proles prenhes que foram submetidas a alterações nutricionais durante a vida intrauterina, Shankar e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição da prole à obesidade materna programa seu metabolismo e aumenta a susceptibilidade desta a se tornar obesa.

Samuelsson e colaboradores (2008) demonstraram que a obesidade materna altera a adiposidade da prole e gera disfunções metabólicas e cardiovasculares. Proles hiperlipídicas tendem a exibir adipócitos com alta atividade proliferativa e de lipogênese, além disso, ainda podem apresentar alteração no sistema nervoso para o controle do apetite, na proporção de massa gorda e magra e nas funções do tecido adiposo, como regulação e secreção de adipocinas, levando à obesidade na vida adulta (DESAI e ROSS,

2011).

Com relação a análise de viabilidade gestacional dos grupos MRC e MHL, após a laparotomia dos animais foi realizada a análise macroscópica dos cornos uterinos e em nenhum dos dias de gestação analisados foram constatadas alterações no grupo MHL em relação ao grupo MRC.

Entretanto, por meio da análise microscópica foi observado que há uma tendência dos SI de fêmeas HL serem maiores do que os SI do grupo RC no 6ºddg. Este resultado é contrário ao encontrado por Rhee e colaboradores (2016) que avaliaram o mesmo dia de gestação. Segundo estes autores, fêmeas que consumiram dieta rica em gordura e açúcar apresentaram sítios de implantação com diâmetros variáveis e significativamente menores do que SI camundongos expostos à ração controle.

Com relação ao SI no 10ºddg, foi observado que a área de decídua parecia maior em relação ao grupo controle. Não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham avaliado a morfologia uterina no 10ºddg após o consumo dieta rica em lipídeo. Já com relação aos sítios de implantação no 14ºddg, os quais já possuem placenta desenvolvida, foi constatado que o grupo MHL tinha uma decídua reduzida em relação ao grupo controle. Tal observação vai de encontro com dados publicados por Sferruzzi-Perri e colaboradores (2013), os quais descrevem que fêmeas, que consumiram dieta rica em gordura e açúcar a partir do 1ºddg, apresentaram redução do volume absoluto da decídua no 16ºddg.

Assim como nas mães, as fêmeas do grupo F1HL não apresentaram alterações macroscópicas nos SI no 10ºddg. Entretanto, haviam fêmeas que, após laparotomia, não tinham SI em seus cornos uterinos, o que indicava falha gestacional. De acordo com a literatura a obesidade pode ser prejudicial a gestação, podendo promover problemas reprodutivos até mesmo antes da concepção (EHRMANN, 2005). Embora a prole HL não tenha apresentado diferença significativa de peso até o 60ºDPN, seu índice de massa corpórea neste mesmo dia foi significativo, bem como a diferença de ganho de peso e o Índice de Lee durante a gestação.

Estudos bibliográficos mostraram que em humanos há uma alta taxa de aborto espontâneo em mulheres obesas (BOOTS; STEPHENSON, 2011). Em um estudo retrospectivo, Bellver e colaboradores (2003) demonstraram que a

taxa de aborto pode variar de acordo com o índice de massa corpórea. Segundo esses autores mulheres com sobrepeso apresentam taxa de aborto de 15,5%, em mulheres obesas essa taxa é de 38,1%, enquanto a taxa de aborto em mulheres com peso considerado normal é de apenas 13,3%, o que mostra que o índice de massa corpórea está relacionado ao risco de aborto espontâneo e falha reprodutiva.

Em um estudo com camundongos, Rhee e colaboradores (2016), mostraram uma redução significativa no número de sítios de implantação no dia 8,5 de gestação em fêmeas que consumiram dieta obesogênica. Esses dados indicam que a falha gestacional observada em algumas fêmeas F1HL pode estar diretamente relacionada ao excesso de peso apresentado durante a gestação, impedindo a implantação ou provocando morte embrionária.

Como descrito em nossos resultados, os sítios de implantação de mães e da prole prenhe foram submetidos à citoquímica de lectina DBA para a caracterização e quantificação dos diferentes subtipos de células uNK DBA positivos (PAFFARO Jr et al, 2003; HIYAMA et al, 2011; ZAVAN et al, 2012; LIMA et al, 2012; DEGAKI et al, 2012; CHEN et al, 2012 e ZAVAN et al., 2016). Foram identificados os subtipos mais indiferenciados (subtipos I e II), bem como o subtipo III mais diferenciado e o subtipo IV, que pode ser considerado como senescente.

Em nossas análises também foi identificado um subtipo alterado de células uNK, descrito anteriormente em estudos com camundongos prenhes onde foi realizado o protocolo invasivo da eutanásia cirúrgica intrauterina do embrião (ROMAN, 2001; COPI, 2006; LIMA et al, 2012), o protocolo que mimetiza a infecção por meio da injeção intraperitoneal de LPS (LIPPE, 2007; ZAVAN, 2011; ZAVAN et al., 2016) e em camundongos prenhes após o consumo de dieta hiperlipídica (32% de lipídeo) e hipercalórica (77% de carboidrato) (SALLES, 2014).

Zavan e colaboradores (2016), descrevem o subtipo alterado de célula uNK DBA<sup>+</sup> como sendo um subtipo que apresenta baixa reatividade à lectina DBA em sua membrana e grânulos citoplasmáticos. Devido às características morfológicas apresentadas por este subtipo, estes mesmos autores sugerem que este seja denominado célula uNK DBA<sup>low</sup>. As células uNK de aspecto alterado presentes neste trabalho vão de encontro às alterações descritas por

Zavan e colaboradores (2016) após a injeção intraperitoneal de LPS, sendo assim, seguimos a nomenclatura sugerida por estes autores.

Salles (2014) demonstrou que no 10<sup>o</sup>ddg, após 9 dias de consumo de dieta rica em gordura ou carboidrato, fêmeas de camundongos apresentaram grande quantidade de células uNK DBA<sup>low</sup>, portanto já era esperada a presença deste subtipo nos grupos MHL 10<sup>o</sup>ddg e MHL 14<sup>o</sup>ddg, após o consumo de uma dieta com 60% de lipídeo. Entretanto, não era esperada a presença deste subtipo também no útero prenhe de fêmeas do grupo F1HL no 10<sup>o</sup>ddg. Não há trabalhos na literatura que tenham buscado investigar o útero prenhe, bem como as células imunológicas, em fêmeas prenhes filhas de mães que consumiram dieta hiperlipídica, ou qualquer outra dieta.

Segundo Salles (2014), por se tratarem de células com aspecto morfológico muito semelhante às apresentadas por Zavan (2011) e Lima e colaboradores (2012) após a injeção intraperitoneal de LPS, este subtipo pode ter ocorrido no útero de fêmeas HL e HC (dieta hipercalórica) devido à uma resposta inflamatória. A literatura mostra que a obesidade é uma doença que apresenta um estado inflamatório crônico (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993), a qual induz aumento de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea (RAMOS et al., 2003). Além disso, o consumo de dieta hiperlipídica pode promover o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na placenta de fêmeas que consumiram a dieta por pelo menos 8 semanas antes da cópula (Kim et al., 2014).

A análise estereológica dos subtipos de células uNK nas mães, demonstrou que no 6<sup>o</sup>ddg as fêmeas do grupo MRC e MHL tinham poucas células uNK no endométrio. As células presentes eram, em sua maioria células dos subtipos I e II e se localizavam principalmente nas regiões 1 e 2 dos sítios de implantação. Tais resultados corroboram com o que foi descrito por Paffaro e colaboradores (2003), os quais demonstraram que no 6<sup>o</sup> dia de uma gestação normal de camundongos a maioria das células uNK DBA<sup>+</sup> presentes no útero se localizam preferencialmente em R1 e R2 e são em sua maioria dos subtipos I e II.

Como descrito anterior, não foram encontradas células uNK DBA<sup>low</sup> em quantidade significativa nos SI de MHL no 6<sup>o</sup>ddg. Tais resultados indicam que apenas 5 dias de consumo de dieta não foi capaz de promover alteração na

quantidade e/ou na diferenciação das células uNK DBA<sup>+</sup>.

Novamente, no 10<sup>o</sup>ddg, os dados encontrados nas fêmeas MRC corroboram com dados presentes na literatura (Paffaro et al., 2003), os quais descrevem que neste dia há grande quantidade de células por toda a região de decidua basal. Como descrito por Paffaro e colaboradores (2003), neste dia de gestação há grande quantidade de células do subtipo I e II na R1, um elevado número de células uNK DBA<sup>+</sup> do subtipo III na R2 e alta quantidade de células uNK DBA<sup>+</sup> do subtipo IV na R3, mais próxima ao embrião. Tais descrições vão de encontro com os nossos resultados.

Com relação às fêmeas MHL no 10<sup>o</sup>ddg, estas apresentaram redução de células uNK DBA<sup>+</sup> nas 3 regiões dos sítios de implantação. Concomitante à redução de células dos subtipos I e II na R1, houve um aumento de células uNK DBA<sup>low</sup>. Já na R2 ocorreu redução significativa de células uNK do subtipo III ao mesmo tempo em que foi observado aumento significativo de células uNK DBA<sup>low</sup>. O mesmo ocorreu na R3 com as células do subtipo IV, as quais estavam reduzidas, ao passo que as células uNK DBA<sup>low</sup> encontravam-se em grande número. Tais resultados mostram que o consumo de dieta HL 60% foi capaz de promover alteração dos 3 subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup>.

Nossos resultados corroboram com os apresentados por Salles (2014), De acordo com esta autora, o consumo de dieta hiperlipídica 32% promove redução significativa de células uNK DBA<sup>+</sup> dos subtipos II e III concomitante a aumento de células uNK DBA<sup>low</sup> nas 3 regiões dos sítios de implantação de fêmeas HL, demonstrando que a dieta promoveu alteração desses 2 subtipos. Ao comparar nossos resultados, podemos entender que o uso de uma dieta com 60% de gordura durante os mesmos 9 dias descritos por Salles, foi capaz de aumentar a quantidade de células uNK DBA<sup>low</sup>, uma vez que nosso trabalho demonstrou, além de redução dos subtipos II e III, redução dos subtipos I e IV concomitante ao aumento de células uNK alteradas no 10<sup>o</sup>ddg.

Os mesmos resultados apresentados pelos grupos MRC e MHL foram observados nas proles F1RC e F1HL. As fêmeas do grupo F1RC no 10<sup>o</sup>ddg apresentaram grande quantidade de células na região de endométrio. Na R1 a maioria das células uNK DBA<sup>+</sup> encontradas eram células dos subtipos I e II, na R2 a maioria das células encontradas eram do subtipo III e na R3 haviam muitas células do subtipo IV. Além dos resultados serem semelhantes aos

apresentados pelo grupo MRC, também corroboram com os resultados de Paffaro e colaboradores (2003) no 10<sup>o</sup>ddg.

As fêmeas F1HL também apresentaram resultado semelhante ao observado em mães HL no mesmo dia de gestação. Houve redução da quantidade de células uNK DAB<sup>+</sup> dos subtipos I e II na R1, concomitante a aumento de células uNK DBA<sup>low</sup>. Na região 2 ocorreu redução de células do subtipo III e aumento significativo de células alteradas. O mesmo foi observado na R3, onde ocorreu aumento de células DBA<sup>low</sup>, porém nesta região houve diminuição significativa de células do subtipo IV.

Como citado anteriormente, filhas de mães que consomem deita rica em gordura ou encontram-se obesas durante a gestação possuem adiposidade alterada (SAMUELSSON et al., 2008), alta atividade de lipogênese e podem apresentar obesidade na vida adulta (DESAI; ROSS, 2011). Além disso, é descrito que a obesidade e consumo de dieta hiperlipídica tem efeitos danosos na programação fetal e predispõe a prole a alterações cardiometabólicas e, também, no desenvolvimento neural (NERI; EDLOW, 2016). O estudo do efeito da obesidade e da dieta hiperlipídica sobre a geração F1 têm mostrado que ambos os fatores têm efeito em diversos tecidos da prole como, por exemplo, fígado, pâncreas, coração e tecido adiposo (WILLIAMS et al., 2014), tendo sido comprovada alteração no tecido adiposo em nosso estudo.

Tais observações podem explicar o fato de a prole apresentar as mesmas alterações de células uNK observadas em mães que consumiram dieta HL sem, contudo, ter tido contato direto com a dieta.

Com relação as mães no 14<sup>o</sup>ddg, a análise estereológica mostrou que fêmeas MRC tinham predominância de células uNK DBA<sup>+</sup> do subtipo IV nas 3 regiões da decídua basal, semelhante ao que foi descrito por Paffaro e colaboradores (2003) para o 15<sup>o</sup> dia de gestação de fêmeas de camundongos em uma gestação normal. Já o grupo MHL apresentou redução na quantidade de células do subtipo IV nas 3 regiões, ao mesmo tempo em que houve aumento significativo de células uNK DBA<sup>low</sup>.

Uma vez que as células uNK alteradas indicavam ter seus grânulos vazios, foi investigado se houve mobilização do conteúdo granular. Para a análise foi feita a imunofluorescência para perforina, a qual é produzida e armazenada em grânulos pelas células Natural Killer uterinas. A análise se deu

no 10<sup>o</sup>ddg já que a quantidade de células uNK com conteúdo granular é extremamente baixa em sítios de implantação no 6<sup>o</sup>ddg e o conteúdo granular é variável em células do subtipo IV, maioria no 14<sup>o</sup>ddg e consideradas um subtipo senescente. Como descrito anteriormente, no 10<sup>o</sup>ddg há grande quantidade de células do subtipo III que são consideradas células em plena atividade e com grande quantidade de conteúdo granular, por isso fácil de avaliar se estaria ocorrendo ou não mobilização de perforina.

Os resultados mostraram que no 10<sup>o</sup>ddg as fêmeas do grupo MRC apresentavam células altamente reativas ao anti-perforina e possuíam grânulos muito bem marcados. Já nos sítios de implantação de fêmeas MHL as células eram pouco reativas e a marcação para perforina era muitas vezes ausente. Tais resultados corroboram com as observações feitas por Zavan (2011) e Lima e colaboradores (2012), após a injeção intraperitoneal de LPS e estabelecimento de uma resposta inflamatória.

Zavan e colaboradores (2016) descrevem que após a injeção intraperitoneal de LPS, em fêmeas de camundongos prenhes no 10<sup>o</sup>ddg, há redução na marcação para perforina. Entretanto, quando foi realizado o pré-tratamento das fêmeas com nimesulide, um inibidor da COX-2 (Ciclo-oxigenase-2), importante sinalizador da inflamação, não houve alteração na marcação das células uNK para lectina DBA e para perforina. Por meio deste estudo, Zavan e colaboradores (2016) demonstraram que a presença de células uNK DBA<sup>low</sup> e a mobilização de perforina podem ocorrer devido a atividade de COX-2.

A alteração na marcação para perforina no 10<sup>o</sup>ddg após consumo de dieta HL já foi descrito anteriormente (SALLES, 2014). De acordo com a literatura, o consumo desta dieta pode promover aumento na expressão de COX-2 na placenta de camundongos devido a uma resposta inflamatória (NITERT et al., 2013). Embora nosso estudo não tenha avaliado a expressão ou atividade de COX-2, os dados aqui apresentados sugerem que tanto a diminuição na marcação para lectina DBA, bem como a diminuição na reatividade ao anti-perforina nas células uNK, possa envolver os mesmos mecanismos descritos por Zavan e colaboradores (2016) e por Nitert e colaboradores (2013).

Os mesmos resultados observados nos grupos de mães foram

constados nas proles prenhes, as quais também tiveram sua reatividade a perforina avaliada. As fêmeas do grupo F1RC apresentavam células uNK altamente reativas ao anti-perforina, com grânulos muito bem marcados. Entretanto, em fêmeas F1HL essa marcação estava reduzida ou ausente, assim como em mães hiperlipídicas. Novamente a prole prenhe apresenta os mesmos resultados que as mães HL, sem ter tido contato direto com a dieta, o que demonstra a ocorrência do evento de programação fetal (BARKER, 1997).

Para verificar se a ausência de perforina nos grânulos significaria liberação da mesma, foi realizada imunofluorescência para caspase-3 clivada, a qual tem sua atividade na promoção de apoptose. Quando liberada, a perforina se liga à membrana plasmática de células alvo formando poros pelos quais passam proteínas granzimas, outro componente do grânulo de células uNK (LIMA et al., 2012). Uma vez dentro das células alvo a granzima é capaz de promover a ativação de caspase-3 e, conseqüentemente, a apoptose (KEEFE et al., 2005).

A imunofluorescência para caspase-3 clivada mostrou que haviam poucas células positivas para esta proteína na decídua de fêmeas MRC no 10ºddg. Já nas fêmeas MHL a quantidade de células positivas para caspase-3 clivada era maior, o que indica que apenas 9 dias de consumo da dieta foi capaz de promover a apoptose em diversas células da decídua e que a perforina pode estar envolvida neste aumento. Este aumento na reatividade à caspase-3 clivada na decídua uterina de fêmeas prenhes, após o consumo de dieta hiperlipídica, corrobora com estudos já realizados (SALLES, 2014).

O mesmo resultado foi obtido na prole prenhe, entretanto, aparentemente a quantidade de células positivas para caspase-3 clivada na prole HL parece ter sido menor que nas mães HL, porém maior que no grupo F1RC. Essa aparente redução na reatividade à perforina quando comparados os grupos MHL e F1HL pode, talvez, ser explicado pela diminuição significativa na expressão de perforina observada no grupo F1HL no 10ºddg.

Para melhor compreender os eventos ocorridos na decídua devido ao consumo da dieta hiperlipídica, foi realizada a análise da expressão gênica para diversas moléculas ligadas a atividade das células uNK e ao processo de inflamação.

Foi analisada a expressão de perforina e granzima na decídua no 6º, 10º

e 14<sup>o</sup>ddg de mães. Os resultados mostraram que não houve diminuição na expressão de perforina no 6<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup>ddg em fêmeas MHL, o que reforça a hipótese de que a ausência de marcação para perforina nestas fêmeas se deve a liberação desta para o meio extracelular e não devido à redução na expressão. O aumento significativo da expressão de perforina no 14<sup>o</sup>ddg demonstra que as células podem estar produzindo uma maior quantidade desta proteína devido a liberação da mesma para o meio extracelular.

Como exibido em nossos resultados, a expressão de granzima B se assemelha à de perforina, o que é esperado uma vez que a atividade destas duas proteínas é dependente. Sendo assim, não foi constatada alteração na expressão de granzima B no 6<sup>o</sup>e 10<sup>o</sup>ddg, mas houve aumento da expressão desta no 14<sup>o</sup>ddg.

Por meio da análise de expressão gênica foi verificada também a expressão dos receptores Ly49A e B. Como descrito anteriormente, Karlhofer e colaboradores (1992) demonstraram que o receptor Ly49A está envolvido na inibição da atividade lítica das células NK. A diminuição da expressão deste receptor no 6<sup>o</sup>ddg, momento em que ele é mais expresso no grupo controle, pode indicar que houve uma diminuição da inibição da atividade lítica das células uNK, o que ajudaria a explicar a liberação de perforina e granzima.

Com relação ao receptor Ly49B, não foram observadas alterações entre os grupos MRC e MHL em nenhum dos dias de gestação, entretanto, podemos perceber que a expressão deste receptor aumenta com o decorrer da prenhez.

Foi analisada, também, a expressão de IFN- $\gamma$ , o qual é uma citocina pró-inflamatória produzida em especial pelas células uNK DBA<sup>-</sup> durante a gestação (Chen et al., 2012). Ela contribui para o sucesso da implantação, uma vez que tem importante papel no início do remodelamento vascular endometrial, na angiogênese nos SI e, ainda, ajuda a manter a decídua (MURPHY et al., 2009; SEAWARD; BURKE; CROY, 2010).

A ausência de IFN- $\gamma$  durante a gestação de camundongos promove o aparecimento de células uNK com número reduzido de grânulos citoplasmáticos e má formação de vasos sanguíneos, além de ausência de remodelamento das artérias espiraladas dos sítios de implantação (ASHKAR; CROY, 1999; ASHKAR et al., 2000). Entretanto, níveis muito elevados de IFN- $\gamma$  podem ser prejudiciais à sobrevivência do embrião (ROBERTSON et al., 2018).

A expressão de IFN-  $\gamma$  mostrou-se reduzida na decídua do grupo MHL no 6ºddg. Tal observação foi descrita por Parker e colaboradores (2014) no dia 7,5 de gestação, após fêmeas de camundongo consumirem dieta hiperlipídica por um longo período, até mesmo antes da cópula.

Embora a expressão de IFN-  $\gamma$  estivesse diminuída no 6ºddg, não foram observados processos de reabsorção ou outras alterações morfológicas no grupo MHL que indicassem falha gestacional. Esta diminuição nos níveis de expressão de IFN- $\gamma$  não impediu que ocorresse o nascimento de proles com número de filhotes semelhantes ao grupo controle. Isso pode ter ocorrido devido a expressão adequada de IFN- $\gamma$  a partir do 6ºddg.

Nossos resultados não apresentaram diferença na expressão desta citocina no 10º e 14ºddg. Kim e colaboradores (2014), mostraram em seu trabalho que, mesmo fêmeas que consumiram dieta HL por cerca de 8 semanas até o acasalamento, não exibiram alteração na expressão de IFN- $\gamma$  na placenta nos dias 15,5 e 17,5 de gestação.

A análise da expressão de Fator de crescimento endotelial vascular  $\alpha$  (Vegf $\alpha$ ) revelou que houve uma redução significativa na expressão desta molécula na decídua basal no 14ºddg do grupo MHL. Esta citocina desempenha um papel chave na angiogênese da placenta, uma vez que regula a formação de novos vasos, os quais proporcionarão um fluxo sanguíneo adequado para que haja a troca de nutriente e oxigênio entre mãe e feto (PIETRO et al., 2010).

O Vegf $\alpha$  é um dos principais componentes dos grânulos das células uNK DBA<sup>+</sup> (Lima et al., 2012). No 14ºddg foram encontradas diversas células uNK DBA<sup>low</sup>, as quais por sua modificação morfológica nos faz acreditar que haja alteração na sua atividade, como na expressão gênica, o que pode indicar a causa na queda da expressão de Vegf $\alpha$ . Além disso, foi observado que na decídua de fêmeas MHL no 14ºddg há aumento na expressão de perforina e granzima B, nos fazendo crer que as células uNK possam estar com sua atividade voltada para a produção dessas duas proteínas.

Dados da literatura, ainda, mostram que a perforina está relacionada a morte de células do músculo liso dos vasos sanguíneos para permitir tanto a migração quanto a proliferação de células endoteliais (HENDERSON et al, 1999). Ao analisar os dados de expressão gênicas e os encontrados na

literatura, pode-se supor que a maior produção de perforina e granzima B poderá se seguir de uma maior expressão de Vegf $\alpha$  para que haja proliferação de células endoteliais e remodelamento de vasos no grupo MHL.

Foi analisada também a expressão de TNF $\alpha$ , o qual é descrito ser produzido por células uNK presentes na decídua, entre outras células (Hunt, 1993; WU et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Esta molécula é tratada na literatura como uma importante adipocina materna, pois liga o estado nutricional materno e o metabolismo do tecido adiposo às funções da placenta (HOWELL; POWELL, 2017). Nossos resultados mostraram que houve aumento na expressão de TNF $\alpha$  no grupo MRC. De acordo com a literatura, a elevação de TNF $\alpha$  no decorrer da gestação é de grande importância para que haja sucesso do processo de implantação, bem como o desenvolvimento adequado da placenta (HOWELL; POWELL, 2017).

A descoberta de níveis elevados de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de camundongos obesos foi o primeiro indicio de que mediadores inflamatórios teriam papel na obesidade (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Embora este mediador esteja aumentado no tecido adiposo devido a obesidade, nossos resultados mostraram que houve diminuição na expressão de TNF- $\alpha$  no grupo MHL no 14<sup>o</sup>ddg. Kim e colaboradores (2014) mostraram esta redução na expressão TNF- $\alpha$  na placenta de embriões fêmeas no dia 15,5 de gestação, após as mães consumirem dieta rica em gordura por 8 semanas antes de acasalarem. Já Crew, Waddell e Mark (2016), ao analisarem o último dia de gestação (21<sup>o</sup>ddg) não relataram alteração nos níveis de TNF- $\alpha$  no plasma sanguíneo ou na placenta de fêmeas submetidas à dieta de cafeteria.

A análise da expressão de TLR4 foi realizada com a finalidade de verificar se o consumo da dieta HL promoveria o aumento da expressão deste receptor, o qual foi descrito ser capaz de sofrer ativação devido ao consumo de dieta com excesso de ácidos graxos e, assim, desencadear a ativação de células imunológicas (LEE et al., 2003). Embora não tenha sido detectada alteração na expressão de TLR4 em nenhum dos dias de gestação analisados, não há como afirmar que este receptor não esteja desempenhando papel na ativação de células imunológicas no útero, como as células uNK, devido a dieta HL, já que foi verificada apenas a expressão do gene e não a atividade proteica.

Como exemplo do quadro descrito acima, podemos citar a expressão de IFN- $\gamma$  no 10<sup>o</sup>ddg no MRC. De acordo com Ashkar e Croy (1999) a análise, por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), da concentração de IFN- $\gamma$  no SI de camundongos mostrou que há aumento significativo dessa citocina entre 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> ddg, o que corrobora com nossos resultados de quantificação de RNA mensageiro. Entretanto, esses mesmos autores afirmam que o pico de concentração de IFN- $\gamma$  ocorre de maneira concomitante ao pico do número de células uNK, por volta do 10<sup>o</sup> ddg. Esta última observação é contrária aos nossos resultados, os quais mostraram que o 10<sup>o</sup>ddg é o momento de menor expressão de IFN- $\gamma$ . Sendo assim, mesmo que a expressão de TLR4 e citocinas pró-inflamatórias estejam baixas, essas proteínas ainda podem estar atuando de maneira efetiva para promoção de uma resposta inflamatória.

Nossos resultados mostraram que há diminuição da expressão de IL-1 $\beta$  em fêmeas MHL no 14<sup>o</sup>ddg. Já foi descrito na literatura a diminuição da expressão desta interleucina por volta do 15<sup>o</sup>ddg em mães que consumiram dieta HL, entretanto, esta diminuição ocorreu apenas na placenta de embriões fêmeas (KIM et al., 2014). Outro estudo relata que não foi constatado alteração na expressão de IL-1 $\beta$  no 11<sup>o</sup>ddg de fêmeas que consumiram dieta HL semanas antes de ficarem prenhas (MAHANY et al., 2018), o que corrobora com nossos resultados em fêmeas MHL no 10<sup>o</sup>ddg.

Quanto ao TGF- $\beta$ 1, este é regulado pelas citocinas presentes no ambiente uterino durante a gestação e é capaz de promover o aumento ou redução da invasividade das células trofoblásticas durante o processo de implantação e de placentação (CHAOUAT, 2013). A queda da expressão deste sinalizador no 14<sup>o</sup>ddg no grupo MHL pode estar relacionado tanto com a atividade de sinalizadores pró-inflamatórios, bem como pode ocorrer para auxiliar a placenta a adaptar sua morfologia às novas condições geradas pelo excesso de lipídeo no organismo materno.

Embora na literatura esteja descrito que a IL-17a desempenha um papel na indução da inflamação no tecido adiposo durante a obesidade (ZÚÑIGA et al., 2010) e que o consumo de dieta hiperlipídica aumenta os níveis de IL-17a (SHEN et al., 2017), nossos resultados mostraram uma diminuição na expressão desta interleucina em fêmeas MHL no 6<sup>o</sup>ddg.

Resultado semelhante foi obtido na análise da expressão de SOCS3. Além de estar relacionada ao processo inflamatório, SOCS3 mostrou-se importante na indução de resistência à leptina e adaptações metabólicas durante a gestação (ZAMPIERI et al., 2015) e está presente na decídua prenhe onde tem papel na diferenciação de células trofoblásticas (TAKAHASHI et al., 2003). Segundo Roberts e colaboradores (2001), camundongos nocaute para SOCS3 apresentam alterações na formação da placenta e morte embrionária entre o 11° e o 13°ddg. Assim como outras citocinas relacionadas à inflamação analisadas neste trabalho, este sinalizador estava reduzido na decídua de fêmeas MHL no 14°ddg. Com base nesses dados podemos supor que a redução significativa de SOCS3 seria um preditor de alterações morfológicas na placenta de mães MHL, a qual, como já discutido estaria tentando se adaptar às alterações que estão ocorrendo no organismo materno devido a dieta hiperlipídica.

Embora não tenha sido observado aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias em nosso estudo, não podemos afirmar que a dieta não promoveu uma resposta inflamatória, uma vez que a expressão gênica não representa a atividade destas proteínas, na verdade a diminuição da expressão destas citocinas pode indicar o início de uma resposta anti-inflamatória.

Como descrito anteriormente, parte deste trabalho foi realizado na Universidade de Augusta, nos Estados Unidos, em parceria com o Dr. Babak Baban com a finalidade de estudar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre as Células Linfoides Inatas uterinas (uILC). Para isso, foram usadas fêmeas de camundongos ICR, as quais são muito semelhantes as fêmeas de camundongos Swiss utilizadas nas análises feitas no Brasil.

Os resultados mostram que não houve alteração significativa entre os grupos MRC e MHL nas análises realizadas por citometria de fluxo, entretanto, foram verificadas várias tendências de alteração no grupo MHL. Embora não tenham sido observadas alterações significativas entre os grupos de dieta experimental os resultados obtidos são de grande importância, pois contribuem para a compreensão do papel das ILC no decorrer de uma gestação normal, uma vez que há uma carência de dados com relação a essas células recém caracterizadas.

Foi observado neste estudo que há um aumento na quantidade de

células ILC entre o 6° e o 14°ddg, e que há uma tendência no aumento destas células no 6° e 14°ddg no grupo MHL em relação a MRC. A mesma tendência foi observada para as células T no 6° e 10°ddg. Dados da literatura mostram que animais que consumiram dieta rica em gordura apresentaram altos níveis de células T CD4+ e CD8+ no tecido adiposo visceral (GERRIETS; MACLVER, 2014). Entretanto, constatamos que a dieta não foi capaz de alterar o número desses dois tipos celulares de maneira significativa entre os grupos MRC e MHL.

Foi constatado um aumento de IDO nos 3 dias de gestação nas fêmeas que consumiram dieta HL, entretanto este aumento não foi significativo. Segundo a literatura, em uma gestação normal, células Treg auxiliariam na promoção de imunossupressão através da produção de diferentes imunossupressores entre os quais está a IDO, a qual auxilia na indução de um microambiente tolerogênico (GUIMOND et al., 1998; UEMURA et al., 2008) o que contribui na tolerância do sistema imunológico materno ao embrião. Devido ao seu papel anti-inflamatório, se a dieta HL estivesse promovendo um quadro inflamatório na decídua a ação da IDO seria importante para induzir uma resposta ação de citocinas pró-inflamatórias.

Assim como a IDO a IL-10 também pode ser secretada pelas células Treg e teria como papel auxiliar na imunotolerância (ARRUVITO et al., 2007). Nossas análises mostraram que, apesar de não haver diferença entre os grupos MHL e MRC, a quantidade de IL-10 varia significativamente entre os dias de gestação, sendo que há um declínio desta interleucina entre o 6° e 14°ddg. Além de seu papel na imunotolerância a IL-10 desempenha outros papéis na decídua, como auxiliar no controle da invasão de células trofoblásticas por inibir a produção de metaloproteínase 9 (MMP9) (ROTH; FISHER., 1999), por isso há uma grande quantidade desta interleucina no 6°ddg, início da prenhez, seguida de redução na expressão ao longo da gestação. A baixa expressão de IL-10 no 14°ddg pode ser devido ao fato de todo o processo de implantação e de desenvolvimento da placenta já terem ocorrido.

Ao contrário do que foi observado para a quantidade de IL-10 nos sítios de implantação de MHL e MRC, a quantidade de células ILC com marcação positiva para IL-10 aumentou entre o 6° e o 14°ddg. É possível supor que com

o decorrer da gestação a síntese de IL-10 vá se tornando restrita apenas às ILCs ou alguns poucos tipos celulares, uma vez que esta interleucina seria de maior importância no começo da gestação.

Já com relação à molécula ST2, sabe-se que esta é expressa por células ILC do tipo 2 (KARTA; BROIDE; DOHERTY, 2016; GEREMIA; ARANCIBIA-CÁRCAMO, 2017). Nossas análises indicam que há uma tendência no aumento de células que expressão esta molécula principalmente no 6° e 10° dias de gestação.

De acordo com a literatura as células ILC2 teriam grande importância durante a obesidade. Um estudo demonstrou que camundongos ILC2-depleted Rag1<sup>-/-</sup>, os quais não teriam estas células, se tornaram obesos e apresentaram alteração na tolerância a glicose. Entretanto, uma vez que células ILC2 foram transferidas para os animais ILC2-depleted Rag1<sup>-/-</sup> estes apresentaram uma melhora significativa (HAMS et al., 2013). Isso mostra que essa tendência no aumento de ST2 pode estar ocorrendo devido a resposta do sistema imune, provavelmente de células ILC2, à dieta HL.

A análise da quantidade de pAMPK revelou que também há uma grande quantidade desta molécula no 6°ddg seguido de um declínio até o 14°ddg. Skeffington e colaboradores (2016) mostraram que a AMPK está presente tanto no endométrio materno quanto na placenta e possui efeito vasodilatador em camundongos, sendo assim, a grande quantidade de pAMPK nas primeiras fases da gestação são de grande importância, uma vez que é neste momento em que está ocorrendo uma grande remodelação dos vasos e artérias uterinos para dar suporte ao desenvolvimento do embrião.

Já a comparação entre células ST2<sup>+</sup>pAMPK<sup>+</sup> e células ST2<sup>-</sup>pAMPK<sup>+</sup> mostrou que a maior quantidade de células produtoras de pAMPK no início da gestação excetuando-se as células uILC, uma vez que a maior quantidade de células positivas para pAMPK foi de células ST2<sup>-</sup>. Já a tendência de aumento na quantidade de células ST2<sup>+</sup>pAMPK<sup>+</sup> observada no 6° e 10° dias de gestação podem indicar que as células uILC2 têm a capacidade de responder à dieta HL.

## 7 CONCLUSÕES

Por meio das análises realizadas neste trabalho, é possível concluir que dieta hiperlipídica tem grande influência sobre a interface materno-fetal de mães que consomem a dieta, bem como sobre o útero da prole prenhe.

Tal afirmação se faz verdadeira frente aos fatos de a da dieta ter promovido aumento no ganho de peso e da área de tecido adiposo materno, prejudicando o desenvolvimento da prole, pois esta apresentou comprimento naso-anal reduzido, aumento no índice de Lee na vida adulta e durante a prenhez e aumento do ganho de peso e da área de tecido adiposo no 10<sup>o</sup>ddg.

A deita dieta HL alterou ainda, a expressão de N-acetil-D-galactosamina nas células uNK de MHL observadas no 10<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup>ddg e de F1HL prenhe no 10<sup>o</sup>ddg, momentos nos quais foram observadas células uNK DBA<sup>low</sup>.

Além disso, a análise morfológica e estereológica das células uNK nas mães e na prole mostrou que a dieta é capaz de promover alteração não só da reatividade dessas células à lectina DBA, mas também alterar o aspecto dos grânulos citoplasmáticos dessas células, os quais pareciam estar vazios. Já a análise estereológica comprovou que a dieta promove alteração dos 4 subtipos morfológicos de células um uNK maternas e da F1 prenhe.

O consumo da dieta HL foi responsável, também, por promover a diminuição na marcação à perforina em mães e na prole, concomitante ao aumento na reatividade da decídua à caspase-3 clivada, o que indica mobilização de perforina e aumento da incidência de apoptose.

Além das observações já apresentadas, a dieta HL também alterou a expressão de diversos genes na decídua, mesmo após 5 dias de consumo materno. Foi constatada que a dieta promove diminuição da expressão de perforina, Ly49A, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-17a no 6<sup>o</sup>ddg de MHL, além de promover diminuição da expressão de Vegfa, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e SOCS3 e aumento da expressão de perforina e granzima B no 14<sup>o</sup>ddg em fêmeas MHL. Foi comprovada, também, a diminuição significativa da expressão de perforina na decídua de F1HL no 10<sup>o</sup>ddg.

Embora a dieta tenha promovido diversas alterações no útero materno, ela não foi capaz de alterar significativamente a quantidade de células uILC, células T e das proteínas IDO, IL-10, ST2 e pAMPK na decídua materna, nem

de promover falha gestacional em mães HL. Já na prole, a dieta foi promoveu falha gestacional significativa, apesar da prole nunca ter tido contato direto com a dieta, caracterizando um evento de programação fetal. Em suma, o consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação pode, não só promover alterações no ambiente uterino materno, mas também pode comprometer a homeostase da interface materno-fetal da geração F1.

## REFERÊNCIAS

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

AIBA, Y.; OGAWA M. Development of natural killer cells, B lymphocytes, macrophages, and mast cells from single hematopoietic progenitors in culture of murine fetal liver cells. **Blood**, n. 90, v. 10, p. 3923-3930, 1997.

ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Frontiers in Genetics**, v. 2, n. 27, p. 1, 2011.

ANSELL, J.D. et al. Changes in lymphocyte accumulation and proliferation in the lymph nodes draining the pregnant uterus. **Clin. Exp. Immunol**, v. 31, p. 397- 407, 1978.

ARRUVITO, L. et al. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. **J Immunol**, v. 178, n. 4, p. 2572-2578, 2011.

ASHKAR, A.A.; CROY, B.A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Semin Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 235-241, 2001.

ASHKAR, A.A. et al. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol.**, v. 171, n.6, p. 2937-2944, 2003.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine Natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, Guelph, v. 192, p. 259-570, 2000.

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

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

BANDO, C. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 17, n. 7, p.783-789, 2016.

BARKER DJP. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. **Nutrition**, n. 9, p. 807–813, 1997.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, n. 261, p. 412–417, 2007.

BAUER, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J Clin Endocrinol Metab**, Vienna, v. 89, p. 812–822, 2004.

BELLVER et al. Obesity and the risk of spontaneous abortion after oocyte donation. **Fertil Steril.**, v. 79, n. 5, p.1136-40, 2003.

BEST, B. Obesity and fertility. **Horm Mol Biol Clin Invest.**, v. 24, n. 1, p. 5–10, 2015.

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

BLOIS, S.M.; KLAPP, B.F.; BARRIENTOS, G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. **J Reprod Immunol.**, v. 88, n. 2, p. 86-96, 2010.

BOOTS, C.; STEPHENSON, M.D. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. **Semin Reprod Med.**, v. 29, n.6, p. 507-513, 2011.

BOULENOUAR et al. The Residual Innate Lymphoid Cells in NFIL3-Deficient Mice Support Suboptimal Maternal Adaptations to Pregnancy. **Front Immunol.** v. 7, art. 43, 2016.

BREIER et al. Fetal programming of appetite and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 185, p. 73–79, 2001.

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

BULMER, J.N. et al. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. **Hum. Reprod.**, v. 6, n. 6, p. 791-798, 1991.

BULMER, J.N.; WILLIAMS P.J.; LASH, G.E. Immune cells in the placental bed. **Int J Dev Biol.**, v. 54, n. 2-3, p. 281-94, 2010.

BULMER, LASH. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol.**, v. 42, n. 4, p. 511-21, 2005.

BULMER, J.N.; LONGFELLOW, M.; RITSON, A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 622, p. 57-68, 1991.

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

BUTLER, M.G.; MCGUIRE, A.; MANZARDO, A.M. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction. **J Assist Reprod Genet.**, v. 32, p. 495–508, 2015.

CARLINO C, et al. Gismondi, Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. **Blood.**, v. 111, n. 6, p. 3108-3115, 2008.

CHALLIER, J.C. et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, v. 29, n. 3, p. 274-81, 2008.

CHANTAKRU, S. et al. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. **J Immunol.**, v. 168, n. 22-28, 2002.

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

CHAOUAT G, SANDRA O, LÉDÉE N. Immunology of Pregnancy. **Bentham Science Publishers**, 2013.

CHEN Z, et al. DBA-Lectin Reactivity Defines Mouse Uterine Natural Killer Cell Subsets with Biased Gene Expression. **Biol Reprod.** 2012.

CLARKE, A.G.; KENDALL, M.D. The thymus in pregnancy, the interplay of neural, endocrine and immune influences. **Immunol.**, v. 15, n. 11, p. 545-551, 1994.

CONCEIÇÃO EP, et al. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. **Horm Metab Res.**, v. 43, n. 7, p. 513-6, 2011.

COPI, C. **Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomo-secretores das células natural killer uterinas de camundongos.** 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e estrutural) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CREW, R.C.; WADDELL, B.J.; MARK, P.J. Maternal obesity induced by a 'cafeteria' diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. **Placenta**, v. 39, p. 33-40, 2016.

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.**, Guelph, v. 59, p. 175-191, 2003a.

CROY, B.A. et al. Uterine Natural Killer cells do not require interleukin-2 for their

differentiation or maturation. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Guelph, v. 37, p. 463-470, 1997.

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

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

CAMPBELL, K. S. Natural Killer cell protocols, 2. ed. Totowa, NJ. **Humana Press.**, p. 465–503, 2010a.

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

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

CROY, B.A. et al. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **J Reprod Immunol.**, v.19, n. 2, p.149-66. 1991.

DE MOURA, R.F. et al. Metabolic syndrome signs in wistar rats submitted to diferente high-fructose iningestion protocols. **The Bristish journal of Nutrition.**, v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.

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

DESAI, M. ROSS, M.G. Fetal programming of adipose tissue: effects of intrauterine growth restriction and maternal obesity/high-fat diet. **Semin Reprod Med.**, v. 29, n. 3, p. 237-45, 2011.

DIEFENBACH, A.; COLONNA, M.; KOYASU, S. Development, differentiation and diversity of innate lymphoid cells. **Immunity.**, v. 41, n. 3, p. 354–365, 2014.

DOISNE, J.N. et al. Composition, Development, and Function of Uterine Innate Lymphoid Cells. **Journal of Immunology.**, n. 195, p. 3937–3945, 2015.

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

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

EBERL G, et al. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. **Science.**, v. 348, p. 6237-6258, 2015.

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

ERIKSSON, M. et al. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. **J Leukoc Biol.**, v. 76, p. 667-75, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FOA). Disponibiliza dados sobre a agricultura mundial. Disponível em: <<http://www.fao.org>.> Acesso em: 3 abr. 2014.

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

FRIAS, A.E et al. Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2456–2464, 2011.

FRIAS, A.E. et al. Maternal High-Fat Diet Disturbs Uteroplacental Hemodynamics and Increases the Frequency of Stillbirth in a Nonhuman Primate Model of Excess Nutrition. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2456–2464, 2011.

GEREMIA, A.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C.V. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. **Front Immunol.**, v. 8, p. 1296, 2017.

GERRIETS, V.A.; MACIVER, N.J. Role of T cells in malnutrition and obesity. **Front Immunol.**, v. 5, p. 379, 2014.

GIMPFL, M. et al. Ensenauer R. Modification of the fatty acid composition of an obesogenic diet improves the maternal and placental metabolic environment in obese pregnant mice. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.**, v.1863, n. 6, p. 1605-1614, 2017.

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

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

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

GUIMOND, M. J.; WANG, B.; CROY, B. A. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive

- deficits in Natural Killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 217-223,1998.
- HAMS, E. et al. Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. **J Immunol.**, v.191, p. 5349–5353, 2013.
- HANNA J, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. **Nat Med**, Jerusalem. v. 12, p. 1065–1074, 2006.
- HATTA, K. et al. Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2 e ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells. **Reprod Sci.**, v. 18, n. 4, p. 383-390, 2011.
- HAYES, E.K. et al. Trophoblast invasion and blood vessel remodeling are altered in a rat model of lifelong maternal obesity. **Reprod Sci.**, v. 21, n. 5, p. 648-57, 2014.
- HEAD, J.R. Uterine Natural Killer cells during pregnancy in rodents. **Nat. Immun.**, Dallas, v. 15, p. 7-21, 1996.
- HENDERSON, E. L. et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. **Circulation.**, v. 99, n.1, p.96-104, 1999.
- HETHERINGTON, C. M.; HUMBER, D.P. The effects of pregnancy on lymph node weight in the mouse. **J. Immunogenet.**, v. 4, n. 4, p. 271-276, 1977.
- HIBY, S.E. et al. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, Cambridge, v. 23, p. 972–976, 2008.
- HIYAMA, M. et al. Differentiation of uterine natural killer cells in pregnant SCID (scid/scid) mice. **J Vet Med Sci.**, v.73, p. 1337-1340. 2011.
- HO, H. N. et al. Activation status of T and NK cells in the endometrium throughout menstrual cycle and normal and abnormal early pregnancy. **Hum Immunol**, Taiwan, v. 49, p. 130–136,1996.
- HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p.87-91, 1993.
- HOWELL, K.R.; POWELL, T.L. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. **Reproduction.**, v. 153, n. 3, p. R97-R108, 2017.
- HUNT, J. S. et al. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes. **J Reprod Immunol.**, v. 35, n. 2, p. 87-99, 1997.

HUNT, J.S. Expression and regulation of the tumour necrosis factor-alpha gene in the female reproductive tract. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 141–153, 1993.

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

JALECO, A.C. et al. Fetal liver contains committed NK progenitors, but is not in a site for development of CD34<sup>+</sup> cells into T cells. **J. Immunol.**, v. 159, n. 2, p. 694-702, 1997.

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

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

JONES, J. E. et al. Mechanisms of Fetal Programming in Hypertension. **International Journal of Pediatrics.**, v. 2012, v. 584831, 2012.

KAM, E.P. et al. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. **Hum Reprod.**, v. 14, n. 8, p. 2131–2138, 1999.

Karlhofer FM, Ribaud RK, Yokoyama WM. The interaction of Ly-49 with H-2Dd globally inactivates natural killer cell cytolytic activity. *Trans Assoc Am Physicians*. V. 105, p.72-85, 1992.

KARTA, M.R.; BROIDE, D.H.; DOHERTY, T.A. Insights into group 2 innate lymphoid cells in human airway disease. **Curr Allergy Asthma Rep.**, v. 16, n. 8, 2016.

KEEFE, D. et al., Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. **Immunity**, v. 23, n. 3, p. 249-62, 2005.

KESKIN, D.B. et al. TGFbeta promotes conversion of CD16<sup>b</sup> peripheral blood NK cells into CD16<sup>-</sup> NK cells with similarities to decidual NK cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 9, p. 3378-3383, 2007.

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

KIM et al. Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. **Biol Reprod.**, v. 90, n. 6, p. 130, 2014.

KING, A. et al. CD3<sup>+</sup> leukocytes present in the human uterus during early

placentation: phenotypic and morphological characterization of the CD56++ population. **Dev Immunol.**, v. 1, p. 169–90. 1991.

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

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

KING et al., The effects of an obesogenic diet during pregnancy on fetal growth and placental gene expression are gestation dependent. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 1087-90, 2013.

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

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

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

KITAYA, K. et al. IL-15 expression at human endometrium and decidua. **Biol Reprod.**, v. 63, p. 683-697, 2000.

KOGA, K.; MOR, G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. **Am J Reprod Immunol.** v. 63, n. 6, p. 587-600, 2010.

KOOPMAN, L.A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med.**, v. 198, p. 1201–12, 2003.

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

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

KUSAKABE, K.; OKADA, T.; SASAKI, F.; KISO, Y. Cell death of uterine natural killer cells in murine placenta during placentation and preterm periods. **J Vet Med Sci.**, v. 61, n. 10, p. 1093-100. 1999.

KUSAKABE, K.; OTSUKI, Y.; KISO, Y. Involvement of the fas ligand and fas system in apoptosis induction of mouse uterine natural killer cells. **J Reprod Dev.**, v. 51, n. 3, p. 333-340, 2005.

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

KWAN, M. et al. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation, **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1027-1034, 2014.

LAIRD, S.M. et al. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. **Hum Reprod Update**, v. 9, n. 2, p. 163-74, 2003.

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

LANIER, L. L. et al. Activating and inhibitory NK cell receptors. **Adv. Exp. Med. Biol**, v. 452, p.13, 1998.

LASH, G.E. et al. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production, **Hum. Reprod**. v. 26, n. 9, p. 2289-2295, 2011.

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

LASH, G. E. et. al. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production. **Human Reproduction**, n. 26, p. 2289-2295. 2011.

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

LEE, J. Y. et al. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 39, p. 37041-37051, 2003.

LEONARD, S. et al. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification—facts and hypotheses - a review. **Placenta**, v. 27, p. 40-46. 2006.

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

LIANG, C.; De COURCY, K.; PRATER, M. R. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. **Metabolism Clinical and Experimental.**, v. 59, p. 943-950, 2010. LIMA et al., 2012.

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

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

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

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

LYSIAK, J.J.; LALA, P.K. In situ localization and characterization of bone marrow-derived cells in the deciduas of normal murine pregnancy. **Biol Reprod.**, v. 47, p. 603-613, 1992.

MAHANY, E.B. et al. Obesity and High-Fat Diet Induce Distinct Changes in Placental Gene Expression and Pregnancy Outcome. **Endocrinology.**, v. 159, n. 4, p. 1718-1733, 2018.

MAKRIGIANNIS, A.P. et al. A BAC Contig Map of the LY49 Gene Cluster in 129 Mice Reveals Extensive Differences in Gene Content Relative to C57BL/6 Mice. **Genomics**, v.79, n. 437, 2002.

MALE, V. et al. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. **J Immunol.**, v. 185, p. 3913–3918, 2010.

MANASTER, I.; MANDELBOIM, O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. **Placenta**. S60-6. 2008.

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

MANASTER, S. et al. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy, **J. Immunol.**, v. 181, n. 3, p. 1869-1876, 2008.

MAO, J. et al. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, p. 5557–5562, 2010.

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

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

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

MEDINA KL, KINCADE PW: Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 91, n. 12, p. 5382-5386, 1994.

MESSINIS, I.E. et al. Polycystic ovaries and obesity. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**., v. 29, p. 479-488, 2015.

MICHIE, A.M. ZÚÑIGA-PFLÜCKER JC. In vivo detection of intracellular signaling pathways in developing thymocytes. **Dev Immunol**., v. 8, n. 1, p. 31-45, 2000.

MOFFETT-KING, A, Natural killer cells and pregnancy **Nature Reviews Immunology**., v. 2, p. 656–663, 2002.

MOORE, T.A.; BENNETT, M.; KUMAR, V. Natural killer cell differentiation: past, present, future. **Immunol. Res.**, v. 15, n. 2, p. 151-162, 1996.

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

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

NAKAMURA, M.C.; SEAMAN, W.E. Ligand interactions by activating and inhibitory Ly-49 receptors. **Immunol Rev**., v. 181, p.138-48, 2011.

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

NERI, C.; EDLOW, A.G. Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. **Cold Spring Harb Perspect Med**., v. 6, n. 2, p. a026591, 2016.

NG, S-H. et al. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. **Research Letter**., v. 467, p. 963-967, 2010.

NITERT, M.D. et al. Maternal high-fat diet alters expression of pathways of growth, blood supply and arachidonic acid in rat placenta. **J Nutr Sci**., v. 2, p. e41, 2013.

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

4770, 2000.

OLCESE, L. et al. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. **J Immunol.**, v. 156, n. 12, p. 4531-4534, 1996.

OLIVIER, J. D. A et al. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the off spring. **Psychopharmacology**, n. 217, p. 419–432, 2011.

PACE, D.; MORRISON, L.; BULMER, J.N. Proliferative activity in endometrial stromal granulocytes throughout menstrual cycle and early pregnancy. **J Clin Pathol.**, v. 42, p. 35-39, 1989.

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

PARKER, V.J. et al. Diet-induced obesity may affect the uterine immune environment in early-mid pregnancy, reducing NK-cell activity and potentially compromising uterine vascularization. **Int J Obes**, Londres, v. 38, n. 6, p.766-74, 2014.

PASQUALI, R.; PATTON, L.; GAMBINERI, A. Obesity and infertility. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.**, v. 14, n. 6, p. 482-7, 2007.

PEEL, S.; STEWART, I.J.; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse. **Tissue Res.**, v. 2, p. 33647-653, 1983.

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

PFAFFLA, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PIETRO et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. **Placenta**. v. 31, n. 9, p. 770-80, 2010.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; HANSSENS, M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. **Placenta**, v. 27, n. 9–10, p. 939–58, 2006.

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

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

POLLARD, J.W. et al. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. **Dev Biol.**, v.148, n.1, p. 273-83, 1991.

PONDER, K.L. et al. Maternal depression and anxiety are associated with altered gene expression in the human placenta without modification by antidepressant use: implications for fetal programming. **Dev Psychobiol.**, v. 53, n. 7, p. 711-23, 2011.

PUZANOV, I.J.; BENNETT, M.; KUMAR, V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. **J Immunol.**, v. 157, n. 10, p. 4282-5, 1996.

QIAO, L. et al. Maternal High-Fat Feeding Increases Placental Lipoprotein Lipase Activity by Reducing SIRT1 Expression in Mice. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3111-3120. 2015.

QIU, Y. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1292-308, 2014.

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

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

RHEE, J.S. et al. Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. **Hum Reprod.**, v. 31, n. 6, p. 1315-26, 2016.

ROBERTSON, S.A. et al. Embryotoxic cytokines-Potential roles in embryo loss and fetal programming. **J Reprod Immunol.**, v. 125, p. 80-88, 2018.

ROBSON, A. et al. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. **FASEB J.**, v. 26, n. 12, p. 4876–4885, 2012.

ROLLENHAGEN, C.P.; ASIN, S.N.P. IL-8 Decreases HIV-1 Transcription in Peripheral Blood Lymphocytes and Ectocervical Tissue Explants. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 54, n. 5, p. 463-9, 2010.

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

ROSMARAKI, E.E. et al. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. **Eur J Immunol.**, v. 31, p.1900–1909, 2001.

ROTH, I.; FISHER, S.J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP- 9 production and invasion. **Dev Biol.** v. 205, p. 194-204, 1999.

SALLES, E. S. L. **Responsividade das células natural killer uterinas DBA+ às alterações nutricionais durante a prenhez de camundongos.** 2014. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

SAMUELSSON, A.M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 383-392, 2008.

SASAKI, K.; ITO, T. Effects of pregnancy and lactation on the peripheral lymphatic tissue in the mouse: qualitative and quantitative morphology. **Arch. Histol. Jpn.**, v. 43, n. 5, p. 423-236, 1980.

SCHLOTZ, W.; PHILLIPS, D. I. W. Fetal origins of mental health: Evidence and mechanisms. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. 23, p. 905-916, 2009.

SCHULTE, M.M.; TSAI, J.H.; MOLEY, K.H. Obesity and PCOS: the effect of metabolic derangements on endometrial receptivity at the time of implantation. **Reprod Sci.**, v. 22, n. 1, p. 6-14, 2015.

SEAWARD, A.V.; BURKE, S.D.; CROY, B.A. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. **Hum Reprod.**, v. 25, n. 11, p. 2829-2839, 2010.

SEAWARD, A.V.C. et al. Interferon gamma contributes to preimplantation embryonic development and to implantation site structure in NOD mice. **Human Reproduction.**, v. 25, n. 11, p. 2829-2839, 2010.

SEKI, Y. et al. Minireview: Epigenetic Programming of Diabetes and Obesity: Animal Models. **Endocrinology**, n. 153, p. 1031-1038, 2012.

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

SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 294, n. 2, p. R528-38, 2008.

SHEN, T. et al. Interleukin-17A exacerbates high-fat diet-induced hepatic steatosis by inhibiting fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.**, v. 6, p. 1510-1518, 2017.

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

SIMONI, Y.; NEWELL, E.W. Dissecting human ILC heterogeneity: more than just three subsets. **Immunology**, v. 153, n. 3, p. 297-303, 2018.

SKEFFINGTON, K. L. et al. Hypoxia, AMPK activation and uterine artery vasoreactivity. **J Physiol.**, v. 594, n. 5, p. 1357-69, 2016.

SMITH, K.M. et al. LY49D and LY49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. **J. Immunol.**, v. 161, n. 1, p. 7-10, 1998.

SUZUKI, K. et al. Maternal smoking during pregnancy and childhood growth trajectory: a random effects regression analysis. **J Epidemiol.**, n. 22, p. 175-178, 2012.

TAKAHASHI Y, et al. SOCS3: An essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. **EMBO J.**, v. 22, p. 372-384, 2003.

TALMOR, A.; DUNPHY, B. Female obesity and infertility. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, v. 29, p. 498–506, 2015.

TARRADE, A. et al. Sexual dimorphism of the feto-placental phenotype in response to a high fat and control maternal diets in a rabbit model. **PLoS One**, v. 8, n.12, p. e83458, 2013.

TIBBETTS, T.A. et al. Progesterone receptors in the thymus are required for thymus involution during pregnancy and for normal fertility. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, n. 21, p. 12021-12026, 1999.

TILBURGS, T. et al. Fetal-maternal HLA-C mismatch is associated with decidual T cell activation and induction of functional T regulatory cells. **J Reprod Immunol.**, v. 82, n. 2, p. 148–157, 2009.

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

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

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

UEMURA, Y. et al. Role of human non-invariant NKT lymphocytes in the maintenance of type 2 T helper environment during pregnancy. **Int Immunol.**, v. 20, n. 3, p. 405-412, 2008.

VACCA, P. et al. CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursors are present in human

decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, n. 6, p. 2402-2407, 2011.

VAN DEN HEUVEL, M.J. et al. A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **Am J Reprod Immunol.**, v. 54, n. 6, p. 322-31, 2005.

VERMA, S. et al. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol Reprod.**, v. 62, p. 959–68, 2000.

VIVIER E, et al. Functions of natural killer cells. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 5, p. 503-510, 2008.

WALDMANN, T. A. The Biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Microsc Res Tech.**, v. 60, p. 420-429. 2006.

WANG C, et al. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. **Microsc Res Tech.**, v. 60, p. 420–429, 2003.

WILLIAMS, L.; SEKI, Y.; VUGUIN, P.M.; CHARRON, M.J. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1842, p. 507–519, 2014.

WILLIAMS, N.S. et al. Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro system. **Immunol. Rev.**, v. 165, p. 47-61, 1998.

WILLIAMS, P.J. et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy, **J. Reprod. Immunol.**, v. 82, n. 1, p. 24-31, 2009.

WIRA, C.R.; FAHEY, J.V. SENTMAN, C.L.; PIOLI, P.A.; SHEN, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunol Rev.**, v. 206, p. 306-335, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Genebra, Suíça. Disponibiliza informação sobre a saúde da população mundial. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/). Acesso em: 16 abr. 2018.

WU, X. et al. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cell Mol Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 131-7, 2006

WU, G. et al. Maternal nutrition and fetal development. **The Journal of Nutrition.**, v. 134, n. 9, p. 2169-2172, 2004.

XIONG, A.M. et al. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation, **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 10, p. 4264-4272, 2013.

XU Y, et al. Innate lymphoid cells at the human maternal-fetal interface in spontaneous preterm labor. **Am J Reprod Immunol.**, v. 79, n. 6, p. e12820, 2018.

YADI H, et al. Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **J Immunol.**, v. 181, n. 9, p. 6140-7, 2008.

YAGITA, H., et al. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Adv Immunol.**, v. 51, p. 215–242, 1992.

YANJNIK, C. S., DESHMUKH, U. S. Fetal programming: Maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 13, n. 2, p. 121-127, 2012.

YE, W. et al. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 2405-2410, 1996.

YU, J. W. M. et al. Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. **Immunity**, v. 24, n. 5, p. 575-90, 2006.

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

ZAMPIERI, T.T. et al. SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. **Mol Metab**, v. 4, n. 3, p. 237-245, 2014.

ZAVAN, B. et al. Adhesion Molecules in mouse pregnant uterus. **Anat Rec.**, v. 293, p. 1081-1088, 2010.

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

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

ZAVAN, B. et al., COX-2 plays a role in angiogenic DBA (+) uNK cell subsets activation and pregnancy protection in LPS-exposed mice. **Placenta**, v. 44, p. 34-45, 2016.

ZHANG, J. et al. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell Mol Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2011.

ZHANG, J. et al. Toll-like receptor 3 agonist enhances IFN-gamma and TNF-alpha production by murine uterine NK cells. **Int Immunopharmacol.**, v. 7, n. 5, p. 588-96, 2007.

ZHANG, J. et al. Toll-like receptor 3 agonist enhances IFN-gamma and TNF-alpha production by murine uterine NK cells. **Int Immunopharmacol.**, v. 7, n. 5, p. 588-96, 2007.

ZÚÑIGA, L.A. et al. IL-17A regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. **J. Immunol.**, v. 185, p. 6947–6959, 2010.

## ANEXOS

## Anexo a

Tabela 1- Dados do delta de ganho de peso materno.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média (g)	DP	N	Média (g)	DP	N
2°	0,97	1,91	11	1,32	0,70	7
4°	1,79	1,50	11	3,44	0,99	7
6°	2,54	1,80	11	4,34	1,36	7
8°	3,70	2,05	11	5,66	1,55	7
10°	5,28	2,75	11	7,69	1,54	7
12°	8,27	2,58	11	10,88	2,82	7
14°	12,29	2,95	11	16,59	2,86	7
16°	19,30	3,94	11	23,35	2,99	7
18°	27,55	4,35	11	31,17	3,86	7

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados de média e desvio referentes aos dados apresentados no gráfico da Figura 2a. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 2- Dados área média do tecido adiposo materno.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média ( $\mu\text{m}^2$ )	DP	N	Média ( $\mu\text{m}^2$ )	DP	N
6°	3548,46	845,76	5	4681,04	1481,70	5
10°	3699,70	310,62	4	5140,95	560,015	5
14°	2924,10	1022,26	5	5476,5838	670,61	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados de média e desvio referentes aos dados apresentados no gráfico da Figura 2b. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 3- Dados do número médio de sítios de implantação de mães.

Dias de gestação	MRC			MHL			
	Média	DP	N	Média	DP	N	P
<b>6°</b>	14,4	1,51	5	14	2	5	0,9881
<b>10°</b>	13,6	1,51	5	14,2	2,04	5	0,9618
<b>14°</b>	12,8	2,68	5	13,4	2,79	5	0,9618

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 3g. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais, P- valores de p.

Tabela 4- Dados de média e desvio análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> no 6<sup>o</sup>ddg.

	Subtipos	MRC			MHL		
		Média	DP	N	Média	DP	N
R1	SI	4,13	0,64	5	3,17	1,09	5
	SII	1,66	0,88	5	1,28	0,74	5
	SIII	0	0	5	0,02	0,05	5
	SIV	0	0	5	0	0	5
	DBA <sup>low</sup>	0,05	0,09	5	0,28	0,31	5
R2	SI	2,86	0,31	5	2,53	1,06	5
	SII	1,94	1,77	5	1,15	0,79	5
	SIII	0,02	0,05	5	0	0	5
	SIV	0	0	5	0,07	0,15	5
	DBA <sup>low</sup>	0,15	0,20	5	0,27	0,42	5
R3	SI	2,03	0,93	5	1,31	0,71	5
	SII	0,86	0,23	5	1,02	0,57	5
	SIII	0,05	0,05	5	0,02	0,05	5
	SIV	0,05	0,09	5	0,22	0,44	5
	DBA <sup>low</sup>	0	0	5	0,22	0,37	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes aos gráficos das Figuras 12a, b e c. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 5- Dados de média e desvio análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> no 10<sup>o</sup>ddg.

	Subtipos	MRC			MHL		
		Média	DP	N	Média	DP	N
R1	SI	11,31	8,14	5	1,62	0,29	5
	SII	22,91	9,73	5	3	2,53	5
	SIII	0,49	0,62	5	0,04	0,06	5
	SIV	0	0	5	0,07	0,10	5
	DBA <sup>low</sup>	0,33	0,26	5	35,13	9,44	5
R2	SI	0,02	0,05	5	0	0	5
	SII	2,69	1,85	5	0,09	0,14	5
	SIII	10,58	0,89	5	0,2	0,28	5
	SIV	1,64	1,91	5	0,29	0,35	5
	DBA <sup>low</sup>	0,39	0,59	5	23,13	2,43	5
R3	SI	0	0	5	0	0	5
	SII	0,4	0,15	5	0	0	5
	SIII	3,27	1,08	5	0,18	0,39	5
	SIV	16	5,08	5	2,75	1,43	5
	DBA <sup>low</sup>	0,24	0,49	5	23,78	2,34	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes aos gráficos das Figuras 12d, e e f. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 6- Dados de média e desvio análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> no 14<sup>o</sup>ddg.

	Subtipos	MRC			MHL		
		Média	DP	N	Média	DP	N
R1	SI	0	0	5	0	0	5
	SII	0	0	5	0,07	0,10	5
	SIII	0,74	1,25	5	0	0	5
	SIV	15,08	2,11	5	4,13	2	5
	DBA <sup>low</sup>	0,05	0,09	5	9,55	2,31	5
R2	SI	0	0	5	0	0	5
	SII	0	0	5	0	0	5
	SIII	0,11	0,08	5	0,02	0,05	5
	SIV	15,97	0,33	5	5,13	2,3	5
	DBA <sup>low</sup>	0	0	5	9,89	1,96	5
R3	SI	0	0	5	0	0	5
	SII	0,11	0,19	5	0	0	5
	SIII	0,17	0,23	5	0,04	0,06	5
	SIV	13,75	3,43	5	3,18	2,09	5
	DBA <sup>low</sup>	0,03	0,05	5	10,04	1,59	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes aos gráficos das Figuras 12h, i e j. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 7- Dados de média e erro análise de expressão gênica Perforina.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6 <sup>o</sup>	1,59	0,24	5	1,37	0,15	5
10 <sup>o</sup>	44,16	6,03	5	30,23	5,28	5
14 <sup>o</sup>	149,89	16,19	5	233,29	23,92	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16a. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 8- Dados de média e erro análise de expressão gênica Granzima B.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6 <sup>o</sup>	1,29	0,098	5	1,14	0,14	5
10 <sup>o</sup>	10,41	1,58	5	8,2	1,70	5
14 <sup>o</sup>	16,62	1,03	5	30,13	4,33	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16b. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 9- Dados de média e erro análise de expressão gênica Ly49A.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,67	0,15	5	0,13	0,05	5
10°	0,02	0,01	5	0,01	0,01	5
14°	0,26	0,08	5	0,12	0,02	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16c. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 10- Dados de média e erro análise de expressão gênica Ly49B.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	1,61	0,25	5	0,67	0,19	5
10°	2,07	0,36	5	1,95	0,62	5
14°	2,61	0,38	5	3,22	0,55	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16d. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 11- Dados de média e erro análise de expressão gênica IFN $\gamma$ .

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,49	0,11	5	0,14	0,06	5
10°	0,01	0,005	5	0,01	0,005	5
14°	0,16	0,04	5	0,08	0,01	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16e. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 12- Dados de média e erro análise de expressão gênica VEGF $\alpha$ .

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	1,21	0,06	5	1,05	0,09	5
10°	0,35	0,03	5	0,29	0,05	5
14°	0,75	0,11	5	0,42	0,04	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16f. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 13- Dados de média e erro análise de expressão gênica TNF $\alpha$ .

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	1,07	0,12	5	1,91	0,06	5
10°	5,14	0,66	5	5,72	0,82	5
14°	8,48	0,79	5	4,93	1,29	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16g. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 14- Dados de média e erro análise de expressão gênica TLR4.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,92	0,12	5	0,60	0,19	5
10°	1,09	0,74	5	1,07	0,35	5
14°	1,33	0,66	5	0,78	0,30	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16h. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 15- Dados de média e erro análise de expressão gênica IL-1 $\beta$ .

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,62	0,157	5	0,11	0,05	5
10°	0,02	0,005	5	0,02	0,01	5
14°	0,29	0,09	5	0,09	0,02	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16i. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 16- Dados de média e erro análise de expressão gênica TGF- $\beta$ 1.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	1,48	0,10	5	1,5	0,10	5
10°	3,72	0,28	5	3,80	0,59	5
14°	7,47	0,66	5	5,38	0,61	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16j. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 17- Dados de média e erro análise de expressão gênica IL-17a.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,75	0,14	5	0,16	0,08	5
10°	0,01	0,003	5	0,01	0,006	5
14°	0,28	0,08	5	0,10	0,03	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16k. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 18- Dados de média e erro análise de expressão gênica SOCS3.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,81	0,08	5	0,60	0,07	5
10°	0,52	0,04	5	0,46	0,05	5
14°	0,91	0,15	5	0,5	0,05	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 16l. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 19- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo ILC (CD127<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>).

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
<b>6°</b>	0,062	0,043	5	0,24	0,25	5
<b>10°</b>	0,47	0,33	5	0,31	0,17	5
<b>14°</b>	0,06	0	6	0,96	0,76	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17a. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 20- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo células T (CD127<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>).

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,12	0,06	5	0,24	0,20	5
10°	0,11	0,09	5	0,19	0,17	5
14°	0,21	0,14	6	0,13	0,15	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17b. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 21- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo IDO.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,87	0,51	3	2,95	2,91	4
10°	0,61	0,29	5	1,48	0,93	4
14°	0,73	0,43	4	2,14	3,51	4

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17c. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 22- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo IDO<sup>+</sup>ILC<sup>+</sup>

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,013	0,01	4	0,02	0,01	4
10°	0,03	0,02	5	0,05	0,06	4
14°	0,04	0,04	4	0,05	0,05	4

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17d. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 23- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo IL-10.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	32,13	10,72	4	33,76	17,67	4
10°	7,74	7,17	5	16,83	12,07	4
14°	11,68	9,93	4	7,85	7,29	4

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17e. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 24- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo IL10<sup>+</sup>/ILC<sup>+</sup>.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	0,02	0,01	4	0,04	0,02	4
10°	0,02	0,01	5	0,05	0,02	4
14°	0,05	0,02	4	0,06	0,03	4

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17f. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 25- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo pAMPK.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	35,36	16,9	4	37,87	14,03	4
10°	15,65	3,55	4	18,7	17,09	4
14°	16,06	5,35	5	14,13	4,98	6

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17g. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 26- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo ST2.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	2,99	4,91	4	6,87	9,80	4
10°	1,21	0,87	4	2,81	3,32	4
14°	2,54	1,68	5	0,87	0,52	6

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17h. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 27- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo ST2<sup>+</sup>/pAMPK<sup>+</sup>.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	2,97	4,93	4	5,98	8,29	4
10°	0,99	1,02	4	5,01	9,50	4
14°	1,96	1,80	5	0,65	0,69	6

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17i. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 28- Dados de média e erro análise por citometria de fluxo ST2<sup>-</sup>/pAMPK<sup>+</sup>.

Dias de gestação	MRC			MHL		
	Média	EP	N	Média	EP	N
6°	32,39	19,52	6	31,88	8,98	4
10°	14,77	4,16	7	13,69	11,4	4
14°	14,1	6,31	5	13,49	5,33	6

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 17j. MRC- grupo controle; MHL- grupo de dieta hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de animais.

Tabela 29- Dados delta do peso de fêmeas F1 do 2° ao 60°DPN.

Dias pós-natal	F1RC			F1HL		
	Média (mm)	DP	N	Média	DP	N
2	2,07	0,04	5	2,02	0,10	5
4	2,91	0,13	5	2,82	0,27	5
6	4,03	0,29	5	3,98	0,44	5
8	5,37	0,52	5	5,31	0,66	5
10	6,54	0,64	5	6,65	0,66	5
12	7,51	0,63	5	7,79	0,79	5
14	8,16	0,71	5	8,70	0,74	5
16	8,70	1,05	5	9,68	1,36	5
18	9,61	1,29	5	10,44	0,98	5
20	11,75	1,56	5	12,99	0,94	5
22	14,17	2,71	5	15,59	1,14	5
24	17,38	2,27	5	18,84	1,11	5
26	20,62	2,44	5	21,88	1,10	5
28	23,90	2,38	5	24,41	1,64	5
30	26,39	2,16	5	27,37	1,38	5
32	28,35	2,01	5	29,05	1,45	5
34	29,8	1,84	5	30,29	1,29	5
36	30,61	2,16	5	30,95	1,46	5
38	31,50	2,17	5	31,61	1,62	5
40	31,99	2,24	5	32,18	1,72	5
42	32,75	1,98	5	32,45	1,98	5
44	32,84	2,41	5	32,92	1,78	5
46	34,19	2,043	5	33,22	2,11	5
48	34,57	2,18	5	33,91	1,77	5
50	34,61	2,45	5	34,48	1,86	5
52	35,47	2,27	5	35,07	2,06	5
54	35,96	2,18	5	35,29	1,63	5
56	36,13	2,88	5	35,78	1,88	5
58	35,77	2,78	5	35,98	1,78	5
60	36,69	2,41	5	36,32	1,61	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 18a. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de proles.

Tabela 30- Dados delta do comprimento naso-anal de fêmeas F1 do 2° ao 60°DPN.

Dias pós-natal	F1RC			F1HL		
	Média (mm)	DP	N	Média	DP	N
2	33,99	1,13	5	35,22	0,70	5
4	38,42	0,80	5	38,57	1,99	5
6	40,52	0,82	5	43,35	2,18	5
8	45,75	0,88	5	46,41	2,50	5
10	48,18	0,57	5	50,37	2,078	5
12	50,44	0,67	5	51,85	3,08	5
14	55,58	1,54	5	56,47	2,07	5
16	57,85	2,46	5	61,42	4,59	5
18	61,75	1,63	5	65,41	1,86	5
20	66,45	0,57	5	69,08	1,79	5
22	68,74	1,65	5	72,33	1,69	5
24	73,82	1,52	5	78,55	1,50	5
26	74,97	1,54	5	82,59	3,65	5
28	78,35	1,73	5	83,69	0,52	5
30	80,63	1,37	5	85,68	2,05	5
32	83,79	1,59	5	88,40	0,96	5
34	85,22	1,22	5	88,12	2,59	5
36	88,21	1,42	5	89,72	1,21	5
38	88,53	0,95	5	90,92	0,94	5
40	89,39	0,57	5	91,58	2,44	5
42	88,96	1,27	5	92,81	1,57	5
44	92,55	1,10	5	90,06	2,12	5
46	93,20	2,45	5	91,28	3,69	5
48	94,71	2,01	5	92,51	3,26	5
50	94,97	3,69	5	91,24	1,49	5
52	96,82	3,87	5	93,10	3,98	5
54	98,21	1,79	5	93,52	2,02	5
56	95,99	3,02	5	91,66	2,62	5
58	97,57	4,45	5	92,26	4,99	5
60	99,74	1,09	5	92,10	5,31	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 18b. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de proles.

Tabela 31- Dados do delta médio do ganho de peso de fêmeas F1 no 10°ddg.

	Média (g)	DP	N
F1RC	5,565	1,519	18
F1HL	6,834	1,537	20

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 18c. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de proles.

Tabela 32- Dados da área média de tecido adiposo de F1 no 10°ddg.

	Média ( $\mu\text{m}^2$ )	DP	N
F1RC	3936	872.9	5
F1HL	6063	1685	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 18d. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de proles.

Tabela 33- Dados referentes ao número de sítios de implantação de F1 no 10ºddg.

	Média	DP	N
F1RC	14	1.79	10
F1HL	14.3	2.75	10

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 18h. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de proles.

Tabela 34- Dados de média e desvio análise estereológica dos subtipos de células uNK DBA<sup>+</sup> no 14ºddg.

	Subtipos	F1RC			F1HL		
		Média	DP	N	Média	DP	N
R1	SI	5	3.50	5	4.89	5.93	5
	SII	26.19	2.74	5	3.56	3.30	5
	SIII	0.25	0.25	5	0	0	5
	SIV	0	0	5	0	0	5
	DBA <sup>low</sup>	0.33	0.33	5	33.49	8.92	5
R2	SI	0.03	0.05	5	0.04	0.1	5
	SII	1.44	0.30	5	0.07	0.1	5
	SIII	11.22	2.03	5	0.04	0.06	5
	SIV	0.25	0.37	5	0.51	0.43	5
	DBA <sup>low</sup>	0.28	0.36	5	15.07	1.88	5
R3	SI	0	0	5	0	0	5
	SII	0.11	0.19	5	0.04	0.02	5
	SIII	0.55	0.34	5	0	0	5
	SIV	18.25	1.71	5	2.11	0.77	5
	DBA <sup>low</sup>	0.22	0.32	5	16.73	1.24	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes aos gráficos das Figuras 22a, b e c. F1RC- grupo controle; F1HL- grupo de dieta hiperlipídica; DP- desvio padrão; N- número de animais.

Tabela 35- Dados análise de expressão gênica de Perforina de F1 no 10ºddg.

	Média	EP	N
F1RC	0.998	0.018	5
F1HL	0.714	0.012	5

Fonte: Do autor.

Nota: Tabela mostra os dados referentes ao gráfico da Figura 25. F1RC- prole controle; F1HL- prole hiperlipídica; EP- erro padrão; N- número de proles.

## Anexo b


 US National Library of Medicine  
 National Institutes of Health

PubMed

Format: Abstract

Front Immunol. 2018 Jul 30;9:1759. doi: 10.3389/fimmu.2018.01759. eCollection 2018.

### Innate Immunity of Neonates and Infants.

Yu JC<sup>1</sup>, Khodadadi H<sup>2</sup>, Malik A<sup>2</sup>, Davidson B<sup>1</sup>, Salles ÉDSL<sup>2</sup>, Bhatia J<sup>1</sup>, Hale VL<sup>3</sup>, Baban B<sup>2</sup>.

**Abstract**  
 Many important events occur at birth. The fetus is suddenly removed from a protected intra-uterine environment that is aquatic, warm, and nearly sterile, to the dry, cold external world laden with microbes. To survive, the neonate must interact with many organisms, making use of some, while vigorously defending against the others like a nation conducting trade with friendly countries and guarding against hostile ones from invading it, waging wars if necessary. Although, the neonatal immune system is plastic, however, it is highly tolerant which is due to both the fetal development during gestation as well as significant sudden changes in fetal environment and enormous exposure to the new antigens and intestinal bacteria and their products. This "quiescent mode" of innate immune system is part of a highly regulated process to fulfill all requirements of multi-layered process of early life, implemented effectively through the cells of innate immune system. While, most of the neonatal innate immune cells (e.g., neutrophils and monocytes) present contained activity and lower frequencies compared to their adult counterparts, innate lymphoid cells (ILCs), a distinct cellular component of innate immunity, show higher level of activity and presence during period of infancy compared to later stages of life and adulthood, which may suggest a role for ILCs in variable susceptibility to certain conditions during life time. In this review, while we focus on the characteristics and status of ILCs in neonatal immune system, we also draw an analogy from a national defense perspective because of the great similarities between that and the immune system by providing the known biological counterparts of all five core operational elements, the five Ds of defense, detection, discrimination, deployment, destruction, and de-escalation, with special focus on innate immunity, maternal support, and influence during the neonatal and infancy periods.

**KEYWORDS:** innate immunity; innate lymphoid cell; microbiome; milk; neonate immunity

PMID: 30105028    PMCID: PMC6077196    DOI: 10.3389/fimmu.2018.01759

**Full text links**

**Similar articles**  
 Antimicrobial defenses in the neonate. [Semin Perinatol. 1990]  
 Innate lymphoid cells in intestinal immunity and inflammatory [Cell Mol Life Sci. 2016]  
 Age-Appropriate Functions and Dystunctions of the Neonata [Front Pediatr. 2017]  
 Human cord blood leukocyte innate immune responses to defense collage [Pediatr Res. 2003]  
 Aryl hydrocarbon receptor promotes RORyt+ group 3 ILC [Semin Immunopathol. 2013]

**Cited by 1 PubMed Central article**  
 Innate Lymphoid Cells in the Maternal and Fetal Compartments. [Front Immunol. 2018]

## Anexo c

26/02/2019

Gmail - Track your recent Co-Authored submission to PLAC



Évila da Silva Lopes Salles &lt;evilasalles@gmail.com&gt;

---

### Track your recent Co-Authored submission to PLAC

1 mensagem

Placenta <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
Responder a: Placenta <plac@elsevier.com>  
Para: evilasalles@gmail.com

10 de dezembro de 2018 09:47

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Évila Lopes Salles,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Placenta

Title: Prospective study of mouse DBA+ uterine natural killer cell subsets after nutritional imbalance

Corresponding Author: Valdemar Paffaro Junior

Co-Authors: Évila S Lopes Salles, pH Student; João G de Almeida, undergraduaie; Lismari P da Silva, MS; Bruno Zavan, PhD; Andréa M Amarante-Paffaro, PhD;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/plac/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Évila&lname=Lopes Salles&email=evilasalles@gmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/plac/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=evilasalles@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at [paffaroj@gmail.com](mailto:paffaroj@gmail.com); [pagaroj@unifal-mg.edu.br](mailto:pagaroj@unifal-mg.edu.br).

Thank you,

Placenta

Format: Abstract ▾

Send to ▾

*Respir Physiol Neurobiol.* 2018 Jan;247:96-102. doi: 10.1016/j.resp.2017.09.010. Epub 2017 Sep 28.

## **Metformin influences on respiratory system in obese mice induced by postnatal overnutrition.**

Dias MD<sup>1</sup>, Goulart M<sup>1</sup>, Dalécio C<sup>1</sup>, Enes-Marques S<sup>1</sup>, Salles ÉDSL<sup>2</sup>, Venâncio M<sup>1</sup>, Pereira EM<sup>3</sup>, Paffaro VA Jr<sup>2</sup>, Incerpi EK<sup>1</sup>, Soncini R<sup>4</sup>.

### **+** Author information

#### **Abstract**

Many studies have confirmed the merits of metformin to treat type 2 diabetes, but few studies have addressed its effect on the respiratory system. Moreover, vascular endothelial growth factor (VEGF) is critical to many lung functions. In this way, we evaluated the metformin impact on the lung in treated obese Swiss mice, induced by postnatal overnutrition. Glucose and insulin were detected and the insulin resistance index (HOMA) was calculated; inflammatory cells and nitrite/nitrate concentration (NOx) was quantified from bronchoalveolar lavage, collagen and lung VEGF-a was analysed in the lung tissue and lung mechanics were evaluated by methacholine-induced bronchoconstriction. Values of glucose, insulin, HOMA; VEGF-a and collagen demonstrate the partial ability of metformin to improve the effects of obesity. However, metformin is ineffective in re-establishing the inflammation, shows no effects on NOx and does not restore bronchoconstriction in obese mice. In conclusion, metformin's beneficial effects on lung are questionable in the postnatal overnutrition model of obesity.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**KEYWORDS:** Airway resistance; Bronchoconstriction; Insulin; Obesity; Vascular endothelial growth factor

PMID: 28963087 DOI: 10.1016/j.resp.2017.09.010

[Indexed for MEDLINE] [Free full text](#)