B

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CECÍLIA COPI

EFEITO DA LESÃO EMBRIONÁRIA NOS GRÂNULOS LISOSSOMO-SECRETORES DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER* UTERINAS DE CAMUNDONGOS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Cecília Copi

e aprovada pela Comissão Julgadora

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Áureo T Yamada

Campinas, 2006

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/ UNICAMP C791e
V ____ EX ____
TOMBO BC/ 70359
PROC 16.123-06
C ____ D X
PREÇO 11,00
DATA 18/10/06
Nº CPD ____
BUBID: 389204

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Copi, Cecília
C791e Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomo-secretores das células natural killer uterinas de camundongos / Cecília Copi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Áureo Tatsumi Yamada.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células natural killer. 2. Lisossomo-secretor. 3. Embrião de camundongo. 4. Interface materno-fetal. I. Yamada, Áureo Tatsumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effect of embryo lesion on secretory-lysosome granules of mice uterine-Natural Killer cells.
Palavras-chave em inglês: Natural killer cell; Secretory-lysosome; Mouse embryo; Fetal-maternal Interface
Área de concentração: Histologia.
Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.
Banca examinadora: Áureo Tatsumi Yamada, Valdemar Antonio Paffaro Junior, Paulo Pinto Joazeiro.
Data da defesa: 31/07/2006.
Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Assinatura

Profa. Dra. Sarah Arana

Assinatura

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Aos meus pais, Ulisses e Leontina, pelo carinho dedicado e pela oportunidade de formação.

À minha filha, Diana, por iluminar minha vida e minha alma. Pela compreensão nas horas de ausência e pelo apoio à realização de um objetivo antigo e tantas vezes preterido.

Agradeço especialmente,

À minha irmã de coração, Farideh, por participar de minha vida trazendo espiritualidade, carinho e conhecimento.

À família Nourani pelo apoio em todos os momentos, pela alegria compartilhada e por proporcionar, à mim e à Diana, aconchego emocional e espiritual.

"Na realidade, o conhecimento é um verdadeiro tesouro para o homem; é para ele uma fonte de glória, de graça, de júbilo e exaltação, de alegria e contentamento. Feliz é o homem que a ele segura-se firmemente, e infelizes os desatentos."

"O conhecimento deve ser adquirido, porém, de tais ciências que possam prestar benefícios aos povos da terra, e não daquelas que por meras palavras começam e assim também terminam."

"Religião e ciência são duas asas sobre as quais a inteligência do homem pode pairar nas alturas, com as quais a alma humana pode progredir. Não é possível voar com uma asa apenas!

Dos escritos Bahá'ís

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Gaduação em Biologia Celular e Estutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, por possibilitar a realização deste mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela oportunidade de cursar o mestrado e pela dedicação à minha formação acadêmica. Agradeço imensamente sua orientação neste trabalho, assim como o incentivo, amizade e confiança dedicados.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, por contribuir com seus conhecimentos nos procedimentos laboratoriais, pelas sugestões para superar as dificuldades e pela atenção concedida.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira, pela colaboração e incentivo neste trabalho.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia - UNICAMP, Profa. Dra. Maria Júlia Marques, pela compreensão e atenção.

Ao Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia, IB/UNICAMP, pela disponibilidade de equipamentos e materiais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB/UNICAMP, pelo apoio técnico e uso dos equipamentos.

Aos membros da pré-banca, Prof. Dr. Valdemar Paffaro Jr, Profa. Dra. Sarah Arana e Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela leitura preliminar desta tese, pelas valiosas sugestões e pela atenção dispensada.

Aos amigos Junior, Márcia, Suzana, Fabíola e Eliana pelo suporte em várias etapas deste trabalho, pelo incentivo e pelos momentos compartilhadas.

Aos colegas da pós-graduação, Adriano, Aline, Angela, Carol, Eduardo, Érika, Juares, Juliana, Karina, Luciana, Marlúcia, Patrick, Patrícia, Petra, Priscila, Renata, Thalita e Viviane, pela convivência e apoio durante este período.

Aos docentes do Depto de Histologia e Embriologia - IB/UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas e científicas, em especial à Profa Dra. Carla Beatriz Colares Buzato pelo auxílio didático durante a monitoria e à Profa. Dra. Sarah Arana pelo incentivo, contribuição didática e científica.

Aos funcionários do DHE - IB/UNICAMP, Baltazar, Juvani, Marta, Martinha, Cleusa, D. Raquel e D. Neuzinha pela colaboração.

Às secretárias Rita e Beatiz do DHE - IB/UNICAMP pelo auxílio dispensado durante a realização deste trabalho e à Liliam do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural - IB/UNICAMP, pela assistência durante o curso.

Aos amigos da VISA Norte, principalmente minha coordenadora, Celi Munhoz, pelo apoio e às companheiras de núcleo, Daniela Piasecki e Camila Bonfim, por compreenderem meu cansaço e por incentivarem a conclusão desta tese.

Ao meu futuro genro, Silvio Pinto Anunciação Neto, pela compreensão e paciência.

Aos meus familiares e amigos pela compreensão, incentivo e apoio oferecidos de maneiras tão peculiares.

A todos que em algum momento durante estes anos compartilharam meu interesse e contribuíram para que meu objetivo fosse alcançado.

RESUMO

Durante a gestação normal em primatas e em roedores observa-se o acúmulo de linfócitos *natural killer* no ambiente uterino (uNK). A funções comprovadas das células uNK estão relaciondas com o reconhecimento das células trofoblásticas alogênicas e produção de citocinas imunomoduladoras do ambiente uterino que garantem o sucesso da gestação. Além da produção de citocinas envolvidas na homeostase do ambiente uterino, as uNK produzem e estocam nos seus grânulos moléculas citotóxicas como a perforina e granzimas. Estas moléculas estão envolvidas na resposta imune inata das células NK, com potencial de promover a lise de células alvo. Porém, se ocorre a ativação desta atividade citolítica, ou mesmo se as uNK promovem a secreção deste arsenal de moléculas citolíticas no ambiente uterino em gestação normal, ou em casos de interrupção da gestação, não são conhecidas. Os conhecimentos nesta área não avançam pelas limitações éticas de estudar experimentalmente o ambiente uterino em gestantes humanos e a falta de modelos experimentais estabelecidos em animais laboratoriais. No presente trabalho, propos-se utilizar o modelo experimental de indução de lesões embrionárias para provocar o desequilíbrio do ambiente uterino e avaliar as alterações nas células uNK. Para tanto, foram utilizados camundongos prenhes no 9º dia de gestação que foram submetidas à procedimentos cirúrgicos de lesão do embrião. Amostras uterinas dos sítios de desenvolvimento embrionários de animais de gestação normal, dos animais com embriões lesionados nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos pós-lesão, e dos animais manipulados cirurgicamente sem a lesão embrionária foram coletados e processados para avaliações através de métodos citoquímicos e imunocitoquímicos em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Os sítios uterinos de embriões lesionados apresentaram reação hiperêmica na região mesometrial já aos 10 minutos pós-lesão, que se acentuava nos períodos mais longos de pós-lesão. As células uNK presentes nesta região apresentaram alteração na reatividade pela citoquimica de lectina DBA e immunocitoquímica com a anti-perforina, sendo evidente a gradual redução na intensidade das reações no decurso do tempo pós-lesão. Na análise ultra-estrutural verificou-se a desestruturação dos grânulos lisossomo-secretores, sendo notória a perda do conteúdo do compartimento secretor evidenciada pela reação com o azul-cuprolínico. O compartimento lisossomal do grânulo embora sofra também uma desestruturação pronunciada, mantêm a reatividade para anti-catepsina D, sugerindo a preservação de

parte da sua funcionalidade. A perda do conteúdo do compartimento secretor, notadamente a perforina e os proteoglicanos no período de 10 minutos pós-lesão, sugere a degranulação das uNK e portanto a ativação da atividade citotóxica destas células, numa resposta aguda frente ao desequilíbrio do ambiente uterino afetado pela lesão embrionária. Porém, não foi constatado qualquer indício morfológico da ocorrência da degranulação através do mecanismo exocitose-símile ou ainda, o efeito da ação citolítica sobre as células circunjacentes às uNK ativadas.

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

ABSTRACT

In the uterine environment during normal pregnancy of primates and rodents is seen the accumulation of natural killer lymphocites (uNK). The confirmed functions of uNK cells are related to recognition of allogeneic trophoblast cells and production of immunomodulating cytokines of uterine environment that assure the successful pregnancy. Besides the production of cytokines related to homeostasis of uterine environment, the uNK produce and store citotoxic molecules of perforin and granzymes in their granules. These molecules are involved in the innate immune response of NK cells with potential to promote lysis of target cells. However, whether the lytic activity is triggered or even the uNK promotes the secretion of these sets of cytolitic molecules into the uterus of normal pregnancy or in the miscarriages are not known. The advances of knowledge in this field are slow down due to ethical limitation of experimental studies with human pregnant uterus and lack of well established experimental models in laboratory animal. In the present work it was proposed to use the experimental model of induction of embryo lesions to promote the unbalance of uterine environment and evaluated the changes in uNK cells. Pregnant mice on 9º gestational day were submitted to surgical procedure of embryo lesion and uterine samples from these embryo lesioned sites were collected after 10, 30 and 60 minutes, as did the normal pregnant and sham operated animals. The samples were processed for cytochemical and immunocytochemical evaluations in light and transmission electron microscopy. The embryo lesioned uterine sites showed hyperemic reaction in the mesometrial region as soon as 10 min after lesion which increased as increased the time lapse after lesion. The uNK cells found in these regions showed reactivity changes with DBA lectin cytochemistry and with anti-perforin immunocytochemistry, being noticed the gradual reduction on reaction intensities on course of time after lesion. In the ultrastructural analysis were seen the disruptions of secretory-lysosomes granules with notorious lost of secretory compartment contents as were evidenced by cuprolinic blue cytochemical reaction. In spite of structural organization of lysosome compartment of the granules was also affected it was maintained the anti-cathepsin D positive reaction which suggest the preservation of part of its functionality. The secretory compartment contents lost, notably the perforin and proteoglycans at 10 min after embryo lesion suggest degranulations of uNK and therefore an acute response of these cells by activation of citotoxic activity, under effects of unbalance of uterine environment affected by embryo

lesion. However, it was not detected any morphological evidence of degranulation by exocytosis-like mechanism or even, the cytolitic effect on neighbor cells around the activated uNK cells.

SUMÁRIO

Agradecimentos vii
Resumo ix
Abstract xi
1. INTRODUÇÃO 01
1.1. Células *Natural Killer* uterinas (uNK) 01
1.2. Grânulos lisossomo-secretores 05
1.3. Modelo experimental 09
2. OBJETIVOS 10
2.1. Geral 10
2.2. Específicos 10
3. MATERIAIS E MÉTODOS 11
3.1. Animais 11
3.2. Indução da lesão embrionária 11
3.3. Coletas e processamentos 11
3.3.1. Histoprocessamento para embebição em parafina e cortes de congelação 12
3.3.2. Processamento em resina epóxi 12
3.4. Citoquímica e Imunocitoquímica 13
3.4.1. Citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus* aglutinina) 13
3.4.2. Imunocitoquímica 13
3.4.2.1. Imunoperoxidase 13
3.4.2.2. Imunofluorescência 14
3.4.3. Citoquímica ultra-estrutural 14
4. RESULTADOS 16
4.1. Análise macroscópica 16
4.2. Avaliação morfológica através da citoquímica de lectina DBA 16
4.2.1. Animais controles de gestação normal 16
4.2.2. Animais submetidos à lesão embrionária 17

4.2.3. Padrão de distribuição das células uNK normais e alteradas nos períodos pós-lesão 18

4.3. Análise ultra-estrutural 19

4.4. Reações imunocitoquímicas 20

4.4.1. Catepsina D 20

4.4.2. Perforina 20

4.5. Citoquímica ultra-estrutural com azul cuprolínico 21

5. DISCUSSÃO 22

6. CONCLUSÕES 29

7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA 30

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

1. INTRODUÇÃO

A gestação é uma condição fisiológica com mudanças imunológicas e endócrinas envolvidas na aceitação do feto (Hatthachote *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000), onde a tolerância materna ao feto poderia ser o resultado da interação entre as diferentes células presentes na interface materno-fetal do ambiente uterino. As evidências apontam também para uma rede de mediadores químicos produzidos por células leucocitárias presentes no endométrio como sendo elemento central na imunomodulação (Saito *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2000; Zenclussen *et al.*, 2005). Neste ambiente pode-se observar a presença predominante (70-80%) de uma população linfocitária *natural killer* (NK) $CD3^-$ /$CD56^{bright+}$/CD^{16-} com baixa atividade citotóxica (Vassiliadou & Bumer, 1998; Slukvin *et al.*, 1996), de macrófagos/células dendríticas (20%) e raros linfócitos T (Vassiliadou & Bumer, 1998; Slukvin *et al.*, 1996).

As células *natural killer* (NK) representam uma importante via de defesa imune contra células infectadas, tumores e transplantes alogênicos, sendo a população celular efetora na ação citolítica destas células alvo (Baranov *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000;). As células NK interagem com outras células através de receptores de membrana, classificados como ativadores ou como inibidores, dependendo se a atividade lítica é disparada ou não após a ligação ao receptor. O principal receptor que modula a atividade das células NK em camundongos seria a família de genes LY 49, existente tanto em NK circulantes do sangue periférico, quanto em NK uterinas (Croy *et al.*, 2003). Além da capacidade citolítica, as células NK participam da resposta imune inata produzindo citocinas, principalmente IFN-γ, podendo ter uma ou ambas as capacidades (Trinchieri, 1989; Kurago *et al.*, 1998;Croy *et al.*, 2003) no papel efetor da resposta imune inata.

1.1 Células *Natural Killer* uterinas (uNK)

As células NK do ambiente uterino gestante têm sido caracterizadas como uma subclasse dos linfócitos NK, denominados de NK uterinas (uNK) (Guimond *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000; Moffet-King, 2002). As uNK diferem das demais células NK do sangue circulante (cNK) quanto à composição das citocinas secretadas e quanto à resposta frente ao estímulo por citocinas. Através de análise por microarray (Koopam *et al.*, 2003), comparando a expressão de genes entre a população de células uNK humanas

($CD56^{bright}$) com as duas populações de NK periféricas ($CD56^{bright}$ e $CD56^{dim}$), mostraram diferenças significativas, incluindo expressão seletiva de CD9, galectin-1 e glycodelin pelas células uNK e não pelas cNK. Em camundongos, não há ainda marcadores específicos que distinguam as uNK das cNK, porém, Paffaro Jr e colaboradores (2003) demonstraram que a lectina DBA (*Dolichos biflorus* aglutinina) reage seletivamente com glicoconjugados expressos na superfície celular das uNK que não são compartilhados com cNK ou outros leucócitos.

Em roedores, este acúmulo ocorre na região mesometrial do útero gestante, iniciando concomitantemente à implantação embrionária e gradualmente ocupando a maior extensão tanto do estroma endometrial quanto o miométrio desta região (Croy *et al.*, 1985; Croy & Kiso, 1993; Zheng, 1991; Guimond *et al.*, 1998; Croy, 2003; Paffaro Jr *et al.*, 2003).

O acúmulo de células uNK deve-se ao recrutamento de células precursoras (pré-uNK) provenientes do baço e de linfonodos, que provavelmente podem chegar ao útero em diferentes estágios de diferenciação/maturação (Chantakru *et al.*, 2002). O estágio de maturação com que as pré-uNK migram para o ambiente uterino é ainda controverso, uma vez que, Paffaro Jr e colaboradores (2003) sugerem o processo de proliferação e diferenciação das formas precursoaras das uNK sob a influência do ambiente uterino exclusivamente gestante. Esse recrutamento seletivo de células uNK no útero envolve o controle de moléculas de adesão tanto sobre o deslocamento destas células quanto sobre sua ligação ao endotélio da decídua basal (Chantakru *et al.*, 2002). Há também evidências da regulação hormonal das células cNK durante a gestação, com redução da ativação da sua citotoxicidade provocada pela progesterona (Dosiou & Giudice, 2005).

Em camundongos, as uNK começam a aparecer no ambiente uterino no 5º dia de gestação (dg), restringindo-se à região mesometrial de cada sítio de implantação (Stewart & Peel, 1980; Paffaro Jr *et al.*, 2003). Entre o 9ºdg e o 12º dg há o maior acúmulo de células uNK maduras, que vão se tornando gradualmente escassas até o final da gestação (Delgado *et al.*, 1996; Paffaro Jr *et al.*, 2003).

As células uNK maduras apresentam citoplasma amplo, núcleo com nucléolo evidente e vários grânulos citoplasmáticos (Head, 1996) que são PAS positivos amilase resistentes (Stewart & Peel, 1977, Paffaro Jr *et al.*, 2003). Paffaro Jr e colaboradores (2003) descrevem quatro subtipos morfológicos de uNK, baseados no padrão de reatividade da lectina-DBA na membrana e nos grânulos citoplasmáticos. Estes subtipos

correspondem aos estágios de maturação destas células, sendo as uNK do subtipo I as menores (9 ± 3μm) e sem grânulos. As do subtipo II (13 ± 2μm) exibem alguns grânulos em seu citoplasma. As uNK do subtipo III são as formas plenamente diferenciadas (26 ± 7μm) com muitos grânulos e, as do subtipo IV (30 ± 4μm) que apresentam citoplasma vacuolado, contendo muitos grânulos e núcleo com cromatina irregular seriam correspondentes àquelas em estágio de degeneração por apoptose.

As características ultra-estruturais dos subtipos de uNK também foram descritas por Paffaro Jr e colaboradores (2003). Segundo esses autores, a uNK do subtipo I contém poucas organelas membranosas em seu citoplasma, não apresenta complexo de Golgi nem grânulos e tem núcleo com cromatina condensada em grumos. As de subtipo II ainda exibem núcleo com cromatina condensada, tem alguns grânulos lisossomo-secretores próximo as cisternas do Golgi e projeções da superfície celular semelhantes a microvilos são freqüentes. No subtipo III o núcleo contém eucromatina e nucléolo evidente, no citoplasma há grande quantidade de grânulos lisossomo-secretores geralmente próximos ao C. Golgi bem estruturado, citoplasma rico em glicogênio e RER distribuído por todo o citoplasma. O subtipo IV caracteriza-se por células de contorno irregular, com cromatina em pequenos grumos num padrão semelhante ao apoptótico, com numerosos grânulos e áreas elétron lúcidas (provavelmente devido a extração do glicogênio durante o processamento histológico) no citoplasma, além de RER organizado em agrupamentos paralelos e Golgi menos evidente.

Segundo Paffaro Jr e colaboradores (2003) há um gradiente de distribuição desses subtipos de uNK na região mesometrial do sítio de implantação que varia de acordo com o período gestacional. Os autores descrevem maior incidência do subtipo I e II nas regiões mesometriais próximas ao miométrio enquanto as formas mais diferenciadas das uNK (III e IV) estão distribuídas em áreas do endométrio mais próximas ao embrião.

A presença das células uNK em grande quantidade e apenas durante a gestação tem levantado a questão sobre as possíveis funções dessas células no ambiente uterino. Considerando a grande mobilidade das células NK e seu conteúdo lítico, associado à presença de receptores KIR, as uNK são potencialmente perigosas, podendo ter um papel importante na interrupção da gestação (Croy *et al.*, 2003). Segundo Dosiou e Giudice (2005), o grande aumento no número de uNK no início da gestação dependente de progesterona e a proximidade destas células à área de infiltração de trofoblastos sugerem

que as uNK desempenham um papel importante na regulação da resposta imune materna em relação ao feto bem como no controle do crescimento e invasão dos trofoblastos durante a gestação humana.

A importância das células uNK na imunidade inata no útero também é possível, particularmente nas espécies em que estas células são residentes no útero, ainda que em quantidades menores que durante o início da gestação. O endométrio está potencialmente exposto a antígenos não próprios, mesmo fora do período gestacional, sendo possível que o papel das células uNK seja também de proteção contra infecções (Bulmer & Lash, 2005).

Linhagens de camundongos depletados geneticamente de células linfo-hematopoéticas tem sido usadas para compreender a sua função durante a gestação, observando-se as alterações no ambiente uterino resultantes da ausência de cada tipo celular (Guimond *et al.*, 1997; Croy *et al.*, 2003). Camundongos deficientes de células NK (como Tgε26 e RAG-$2^{0/0}$/$\gamma c^{0/0}$) mostraram características histológicas semelhantes durante a gestação, sendo que as 3 anomalias principais são: ausência de desenvolvimento do agregado linfóide mesometrial, hipocelularidade e edema da decídua basal e persistência de células musculares lisas nas artérias espiraladas acompanhada de dilatação limitada da luz vascular assim como do crescimento dos vasos (Guimond *et al.*, 1998; Ashkar & Croy, 1999). Experimentos realizados com camundongos *knockout* de IFN-γ comprovam a sua produção pelas uNK e a sua importância na manutenção da integridade da decídua, modificação das artérias espiraladas e no desenvolvimento da placenta (Ashkar & Croy, 1999 e Croy *et al.*, 2003). Embora a ausência destas células afete a gestação, ela não a inviabiliza totalmente, como tem sido demonstrado em experimentos com linhagens de camundongos destituídos de células NK (Croy *et al.*, 1985).

Não há evidências de que as células uNK possam desencadear a atividade citotóxica ou resposta imune inata na gestação normal. As diferenças fenotípicas entre as células uNK ($CD56^{+bright}$/ $CD16^{-}$), e cNK ($CD56^{+dim}$/$CD16^{+}$) de humanos parecem resultar em diferenças funcionais, uma vez que, as células $CD56^{+dim}$ apresentam uma alta capacidade citotóxica, enquanto células $CD56^{+bright}$ tem baixa citotoxidade e um grande potencial para produção de citocinas (Miller, 2001; Middleton *et al.*, 2002), o que talvez explique, o comportamento menos agressivo das células uNK na gestação normal, apesar do seu arsenal citolítico nos grânulos citoplasmáticos. Por outro lado, as uNK expressam

diversos genes comuns às cNK em humanos (Cooper *et al.*, 2001), podendo potencialmente atuar na resposta imune inata através dos receptores KIRs, relacionados a inibição ou ativação das funções líticas destas células. Contudo, até o momento não há dados experimentais que comprovem o envolvimento direto das células uNK na resposta imune inata através da ativação da sua função citolítica. Embora o conteúdo dos seus grânulos citoplasmáticos apresente moléculas líticas como perforina e granzima-A (Zheng *et al.*, 1991), não se observa a ativação do seu potencial citolítico na gestação normal.

Desta forma, os estudos até o momento realizados com os camundongos tem demonstrado a importância das células uNK na decidualização, formação da placenta, desenvolvimento do feto e alteração da arquitetura dos vasos sangüíneos uterinos durante a gestação. Porém, as células uNK pertencendo ao sistema imune inato teriam também função efetora, além da reguladora, o que demandaria um controle externo e/ou intrínseco da liberação de proteínas solúveis, como perforina e granzimas contidos nos seus grânulos e, proteínas de membrana, como Fas-ligante (CD95). Nos estudos in vitro com os linfócitos T citotóxicos, a liberação dessas proteínas via lisossomos secretores possibilita estocá-las no interior da célula e controlar precisamente o local e hora de sua liberação, já que a degranulação dos lisossomos secretores é perfeitamente dirigida às células alvo (Stinchcombe & Griffiths 1999).

1.2 Grânulos lisossomo-secretores

As células secretoras especializadas contêm tipicamente duas organelas distintas para suas funções secretora e lisossomal. Já em várias células hematopoéticas essas duas funções podem estar compartimentalizadas em uma mesma organela, o lisossomo-secretor (Clarck & Griffith, 2003).

Os lisossomos-secretores são grânulos especializados que contém no seu interior as hidrolases e proteínas de membrana características dos lisossomos, assim como produtos de secreção especializados dos diferentes tipos celulares em que são encontrados. Funcionalmente servem como lisossomos, com atividade hidrolítica e participação na via endocítica, e como grânulos secretores com atividade degradativa (Stinchcombe & Griffiths, 1999; Clarck & Griffith, 2003), sendo que suas funções são compartimentalizadas por diferentes domínios de pH ótimos de atuação das enzimas. As hidrolases lisosomais requerem pH ácido, mantido no interior da célula, enquanto que

perforina e granzimas do compartimento secretor funcionam apenas sob pH neutro, condição esta obtida apenas após a degranulação (Griffiths, 1997). A estocagem de moléculas citolíticas nestes grânulos é controlada pelo pH ácido e também pela associação com proteoglicanos, que protegem a célula da auto-destruição (Metkar *et al.*, 2002; Clarck & Griffith 2003). Os linfócitos T citotóxicos (CTL) apresentam grânulos lisossomo-secretores semelhantes mas estão presentes apenas em células ativadas. A ligação aos receptores de célula T (TcR) não só dispara a degranulação nos CTL mas também a rápida síntese de novas proteínas citotóxicas que preenchem novamente os grânulos líticos. Neste processo, granzimas e perforina são também secretadas pela via constitutiva, porém não se sabe ainda se os CTL liberam todos os seus grânulos de uma só vez ou não (Griffiths, 1997).

Burkhardt e colaboradores (1990) caracterizam os grânulos líticos de células NK através de estudo em linhagem celular RNK-16 clone CRC. Estes autores analisaram eletromicrografias de cortes seriados e descrevem dois tipos distintos de grânulos, apontando a existência concomitante de várias formas intermediárias entre eles. Os grânulos Tipo I são redondos, delimitados por fina membrana e exibem conteúdo eletrondenso homogêneo. Os grânulos Tipo II são maiores e de formato irregular, contendo em seu interior material vesicular e lamelar. Os grânulos com morfologia intermediária apresentam uma ou mais áreas homogêneas rodeadas por córtex vesicular de tamanho e formato variados.

Morfologicamente, os grânulos lisossomo-secretores típicos das uNK de camundongos exibem áreas periféricas de capuz eletrondensos contendo microvesículas membranosas e um "core" central homogêneo (Paffaro Jr *et al.*, 2003). Nas células uNK, o domínio periférico de microvesículas coincide com a região de maior acúmulo de proteínas lisossomais transmembrana como CD63, Lamp1 e Lamp2 e proteínas solúveis como as catepsinas (Bulmer, 1968; Stewart & Peel, 1977; Zheng *et al.*, 1991; King *et al.*, 1993; Correia da Silva, 1996; Clarck & Griffith, 2003).

Os grânulos de uNK isolados de decídua de humanos contém grande quantidade de lipídios insaturados formando um microdomínio que envolve o "core", sendo possivelmente um componente universal de grânulos citolíticos (Baranov *et al.*, 2000). Segundo estes autores, os lipídios associados aos grânulos podem servir como camada isolante protegendo a membrana lisossômica de lise, ou como sinal autócrino

interrompendo a degranulação, ou ainda como mecanismo adicional de lise celular agindo independente ou sinergicamente com outras moléculas líticas.

Um dos componentes do "core" dos lisossomos secretores é a perforina, um mediador citolítico nos linfócitos T citotóxicos e nas células *natural killer* (Liu *et al*, 1995). Há também evidência experimental do papel da perforina na regulação imune, incluindo indução da ativação da morte celular de CTLs, controle da produção de anticorpos, controle da autoimunidade e regulação da resposta dos CTLs a algumas infecções virais (Liu *et al.*, 1995). Estudo da ativação das células NK circulantes (cNK) por IL-2 e IL-12 (Lehmann *et al.*, 2001), demonstrou que esta ativação resulta no aumento da ligação da perforina com a célula alvo e subsequente aumento da lise pela ação desta molécula citotóxica.

A liberação e atuação lítica da perforina é dependente da presença de ions de cálcio (Ca2+) (Liu *et al.,* 1995), assim como todo processo envolvendo degranulação (Logan *et al.*, 2003). A hipótese clássica de função lítica da perforina refere-se a agregação de monômeros formando uma molécula polimérica com um poro central, contendo pelo menos 3 a 4 monômeros para ter um poro funcional (promovendo lise osmótica) e 10 a 20 monômeros para ser visível à microscopia eletrônica (Liu *et al* 1995). No grânulo lítico, a atuação da perforina é prevenida pelo baixo nível de cálcio, pelo pH ácido e pela presença de proteoglicanos que não favorecem a inserção e polimerização da perforina na membrana (Griffith, 1997).

A perforina tem sido definida biologicamente pela sua habilidade de induzir permeabilização de membrana. No entanto, em concentrações em que a permeabilização é virtualmente inexistente, as células alvo são suscetíveis a apoptose na presença de granzima B (Metkar *et al.*, 2002). A granzima B, outro componente constitutivo do compartimento secretor dos grânulos das NK só é secretada em uma forma macromolecular ligada ao proteoglicano serglicin, e este só induz apoptose na célula alvo quando forma um complexo maior com a perforina. Quanto ao mecanismo de ação, sugere-se também que a perforina, tanto na sua forma monomérica quanto em complexo macromolecular com a serglicin, pode penetrar na célula alvo agindo na liberação da granzima B internalizada em compartimento vesicular (vesícula endossômica), de modo similar a penetração celular mediada por virus (Metkar *et al.*, 2002).

Corroborando com este modelo, Veugelers e colaboradores (2004) afirmam que na apoptose induzida por grânulos, o evento crítico é a endocitose da granzima B, que, *in*

vitro, é mediada por dinamina. Considerando ainda a afirmação de Metkar e colaboradores (2002) de que a granzima B é sempre liberada da célula efetora num complexo macromolecular com serglicin, isso implica que também *in vivo* o mecanismo de endocitose da granzima B é mediado por dinamina. No entanto, não se exclui a via de algumas moléculas citotóxicas atuarem independentemente da dinamina (Veugelers *et al.*, 2004).

Segundo Metkar e colaboradores (2002), o efetor central da apoptose mediada por grânulos é o complexo perforina/granzima B/serglicin. Desta forma, o proteoglicano presente nos "core" dos grânulos teria a função de compactar os componentes do compatimento secretor do grânulo e atuar como um carreador que facilitaria a liberação e a internalização da granzima B e/ou da perforina na ação citolítica.

Raja e colaboradores (2002), estabeleceram a natureza do complexo granzima-serglicin em células da linhagem YT-INDY, demonstrando que o proteoglicano componente dos grânulos citotóxicos destas células é idêntico à serglicin, com massa molecular em torno de 250 kDa. A conformação extendida das cadeias de GAG e a superfície negativamente carregada desta molécula provavelmente confere à serglicin uma área que a capacita a abrigar múltiplas moléculas. Assim, a composição do complexo proteoglicano-proteases nos grânulos de células citotóxicas pode depender dos diferentes componentes granulares competindo pelos sítios de ligação aniônicos. Segundo estes autores, essa pode ser uma estratégia onde a célula alvo internaliza um efetor multimérico para múltiplas vias de morte celular.

Os mecanismos relacionados com a liberação dos conteúdos dos grânulos lisossomo-secretores das uNK ou mesmo das cNK ainda são pouco conhecidos. A exocitose de grânulos secretores ou de vesículas secretoras envolve uma série de eventos, incluindo o deslocamento da vesícula/grânulo até a periferia celular, ligação e ancoragem à membrana plasmática para que ocorra a fusão e liberação dos grânulos (Logan *et al.*, 2003). Os mecanismos intracelulares envolvidos na mobilização dos grânulos secretores e na secreção de mediadores celulares são finamente regulados e, ainda que exaustivamente estudados, não estão totalmente esclarecidos (Clarck & Griffiths, 2003).

A liberação do conteúdo granular, ou degranulação, ocorre pelo menos de 4 maneiras conhecidas até o momento, conforme o tipo celular e o produto de secreção: a) exocitose clássica, envolvendo a liberação pela célula do conteúdo de grânulos

secretores isolados; b) exocitose composta, caracterizada pela fusão intracelular de múltiplos grânulos antes da secreção; c) degranulação fragmentada ou em partes, caracterizada pela liberação de vesículas citoplasmáticas na presença de grânulos cristalóides intactos contendo componentes do "core" parcialmente erodidos e; d) necrose ou citólise, onde a deposição de grânulos intactos no tecido coincide com a morte celular. (Logan *et al.*, 2003). No caso das células NK, os mecanismos estabelecidos para liberação do conteúdo citolítico, coincidem com a exocitose clássica (Griffth, 1997), porém, este processo foi estabelecido através de ensaios *in vitro*.

1.3 Modelo experimental

Roman (2001) desenvolveu um modelo experimental para o estudo do comportamento das células uNK em situações de desequilíbrio ou anormalidade na gestação por meio de lesão embrionária induzida mecanicamente. Seu estudo mostrou a ocorrência de hemorragia observada 1, 6, 12 e 24 horas após a lesão, não apenas nos sítios lesionados, mas também nos sítios adjacentes, comprovando que o trauma mecânico da lesão embrionária induzia uma ação sistêmica no ambiente uterino, com provável liberação de substâncias vasoativas. Uma vez que outros órgãos avaliados não mostraram qualquer alteração, esta substância teria ação local exclusiva sobre os vasos do ambiente uterino. Além disso, a lesão embrionária desencadeou alterações nas células uNK, notadamente a perda do conteúdo granular, e também a degeneração das células trofoblásticas por apoptose. O fato das células uNK perderem o conteúdo granular reativo à lectina DBA (Roman, 2001), é um forte indício de que a lesão embrionária possa desencadear a resposta imune inata destas células com a liberação dos seus mediadores citolíticos.

Tal perspectiva torna interessante o estudo neste modelo de lesão embrionária para avaliar a atividade das células uNK na gestação, uma vez que, até o momento, as funções comprovadas das células uNK têm sido associadas preponderantemente à imunomodulação que controla e viabiliza a gestação normal. O estudo do efeito agudo induzido por lesão embrionária mecânica possibilita analisar o processo de liberação do conteúdo granular nas células uNK e sua possível ação citolítica, que justificaria o arsenal citolítico armazenado em seus grânulos.

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

2. OBJETIVOS

Geral:

- Analisar o efeito agudo da lesão embrionária induzida mecanicamente na morfologia das células uNK presentes no útero prenhe de camundongos nos tempos de 10, 30 e 60 minutos após indução de lesão embrinária, relacionada com a sua atividade citolítica mediada pelos grânulos lisossomo-secretores.

Específicos:

1- Avaliar as alterações morfológicas das células uNK, empregando citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus* aglutinina).

2- Avaliar as alterações ultraestruturais das células uNK, em particular os seus grânulos lisossomo-secretores, sob o efeito da lesão embrionária.

3- Avaliar as alterações constitutivas nos compartimentos dos grânulos citoplasmáticos das células uNK, utilizando métodos citoquímicos e imunocitoquímicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos fêmeas com idades de 10 a 12 semanas e machos com idades de 12 a 48 semanas das linhagens Swiss e C57/B6, procedentes do CEMIB/UNICAMP, sendo que sempre se acasalou exemplares da mesma linhagem. O dia da constatação do tampão vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação (dg). Durante o período dos experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com acesso a água e alimento "ad libitum" em ciclo de dia/noite de 12 horas.

3.2 Indução da lesão embrionária.

Camundongos prenhes no 9º dg foram anestesiados com cloridrato de xylazina (Virbaxyl, Virbac do Brasil) e ketamina (Francotar, Virbac do Brasil) e após laparatomia com a constatação da presença de sítios de implantação embrionária, no mínimo dois destes sítios contidos em um dos cornos uterinos foram lesionados alternadamente através de punção na face antimesometrial com agulha hipodérmica (15 x 5). O corno uterino oposto ao lesionado foi mantido intacto. Após este procedimento, as incisões cutâneas e da fácia muscular foram suturadas com fio cirúrgico. Como controle do procedimento, um grupo de animais foi manipulado igualmente excluindo-se a lesão do sítio embrionário.

As análises realizadas em materiais procedentes de animias submetidos à lesão embrionária não se retringiram aos sítios lesionados, tendo sido também realizadas nos sítios subjacentes não lesionados que apresentaram hiperemia ou hemorragia na região mesometrial.

3.3 Coletas e processamentos

Os animais submetidos à lesão embrionária e os respectivos controles, ainda sob o efeito do anestésico, foram sacrificados nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos pós-lesão através da perfusão da solução fixadora pelo ventrículo esquerdo. Nos animais normais procederam-se às mesmas técnicas de anestesia, laparotomia (sem indução de lesão

embrionária) e perfusão. Foram utilizados 9 animais de cada um dos grupos e intervalos de tempo, num total de 63 animais.

Após avaliação macroscópica dos cornos uterinos, foram feitas as perfusões com 30-50ml da solução de paraformaldeído (Sigma Chemical Co, USA) 4% em tampão fosfato-salina (PBS) 0.1M pH 7,4 e sacarose 0,1M para processamento em parafina ou, paraformaldeído 2,5% e glutaraldeído (Ladd Resaerch, USA) 1,5% em PBS 0,1M pH 7,4 para embebição em resina epoxy.

Dos cornos uterinos removidos foram obtidas fatias de 3 mm de espessura da região mediana dos sítios de implantação embrionária, preservando-se a região onde se localizavam os embriões.

3.3.1 Histoprocessamento para embebição em parafina

Parte das amostras dos espécimes fixados em paraformaldeido 4% foi desidratada em gradientes crescentes de etanol, diafanizada em xilol e embebida em parafina (Histosec, Merck, Brasil), conforme técnica histológica rotineira. Os cortes seriados de 5 µm foram coletados em lâminas previamente silanizadas (Silano - Sigma Chemical Co, USA).

3.3.2 Processamento para embebição em resina epoxi

Os fragmentos fixados em paraformaldeido 2% e glutaraldeido 1,5% foram lavados em PBS 0.05M e pós-fixados em tetróxido de ósmio (Ladd Research, USA) 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após desidratação em gradiente crescente de etanol e óxido de propileno (Aldrich Chemical Co, USA), os fragmentos foram embebidos em resina epoxi (Epon 812 – Polyscience, USA) e polimerizados a 60ºC.

Cortes semi-finos de 1µm foram obtidos em ultramicrótomo MT1 (Sorvall, USA), e corados com azul de toluidina para seleção prévia das áreas para obtenção dos cortes ultrafinos. Os cortes ultra-finos foram obtidos em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, coletados em telas de cobre (150 mesh), contrastados com acetato de uranila 2% (Riedel-de Haenm, Alemanha) durante 20 minutos e citrato de chumbo (Ecibra, Brasil) a 0,5%, durante 10 minutos. As análises ultra-estruturais foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO - EM902.

3.4 Citoquímica e Imunocitoquímica

3.4.1 Citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus* aglutinina)

Foram utilizados cortes desparafinizados processados de acordo com o protocolo estabelecido por Paffaro Jr *et al* (2003), que resumidamente consistiu em tratamento dos cortes com peróxido de hidrogênio 0,3%, seguido de bloqueio com Albumina sérica bovina (BSA tipo V, Sigma, St Louis, USA) a 1% em PBS 100mM e incubação com a lectina DBA biotinilada (Sigma, USA) diluída a 1:300 em PBS 100mM, pH 6,8 durante 12 horas a 4ºC. Após lavagem e incubação com complexo Avidina-Biotina conjugado com peroxidase (Vectastain Elite, Vector, USA), foram reveladas com diaminobenzidina (DAB-Sigma. St. Louis, USA) 0,5mg/ml em tampão tris-HCl (TB) 50mM pH 8,2 e peróxido de hidrogênio 0.3%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permanente em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram observados e documentados no microscópio fotônico Eclipse 800 (Nikon, Japão), acoplado com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e tratamento de imagem digital (ImageProPlus, USA).

3.4.2 Imunocitoquímica

Foram utilizados como anticorpos primários, os anticorpos policlonais de coelho anti-catepsina D (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Sadaki Yokota, Yamanashi Medical School, Yamanashi, Japan) e anti-perforina (gentilmente cedidos pela Keio University, Japan).

3.4.2.1 Imunoperoxidase

Foram utilizados cortes desparanifinizado e hidratados, equilibrados em PBS 100mM, em seguida submetidos ao tratamento com peróxido de hidrogênio 0,3%. Após bloqueio com solução de BSA 1% em PBS 100mM pH 7,4, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS/BSA durante 12 horas à 4ºC. Após lavagem em PBS 50mM, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Dako Co, USA) durante 1 hora à temperatura ambiente. A peroxidase foi revelada com a DAB 5% em TB 50mM pH 8,2 e peróxido de hidrogênio 0,3%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permanente em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram observados e

documentados no microscópio fotônico Eclipse 800 (Nikon, Japão), acoplado com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e tratamento de imagem digital (ImageProPlus, USA).

3.4.2.2 Imunofluorescência

Foram utilizados cortes desparafinizados e hidratadas equilibrados em PBS 100mM e tratados com solução de PBS/BSA 1%. Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-catepsina D ou anti-perforina durante 12 horas a 4ºC e após lavagem em PBS 100mM, foram incubados com o anticorpo secundário de mula anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína ou Cy3 (Sigma, St Louis, USA), diluídos 1:500 e 1:1000 respectivamente, durante 1 hora.

Para dupla marcação com a lectina DBA, foram utilizadas incubações com o anticorpo primário anti-catepsina D ou anti-perforina, seguida do anticorpo secundário conjugados com Cy3, os cortes foram incubados com a lectina DBA biotinilada diluída a 1:200 em PBS 100mM, pH 6,8, durante 2 horas e em seguida incubados com estreptoavidina conjugada com fluoresceína (Chemicon, USA) diluída a 1:500 em PBS 100mM, pH 7,4, durante 30 minutos e montados entre lamínula com o meio Vectashild (Vector Co, USA).

As observações foram realizadas no microscópio Elipse 800 acoplado com sistema de epifluorescência e as imagens digitalizadas pelo sistema de análise de imagem (Image ProPlus, USA).

3.4.3 Citoquímica ultra-estrutural

Um grupo com 2 animais de gestação normal no 9º dg e, de 3 animais cada submetidos a lesão embrionária nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos pós-lesão foram sacrificados por deslocamento cervical. Após laparatomia, os sítios de implantação foram isolados, seccionados sagitalmente na região central com espessura aproximada de 2mm e foram fixados por imersão em solução de glutaraldeido 2,5% em tampão acetato de sódio 25mM, pH5,6 contendo MgCl2 0,3M e azul cuprolínico (BDH Chemicals Ltd, Poole, UK) 0,2% durante 12h a temperatura ambiente. Após lavados em tampão acetato de sódio/MgCl2, os fragmentos foram desidratados em soluções crescentes de etanol contendo tungstato de sódio (Sigma, USA) 1%, seguido de gradiente de óxido de

propileno e embebidos em resina Spurr (Ladd Researcgm, USA). Foram obtidos cortes semi-finos de 1μm em ultramicrótomo MT1 (Sorvall, USA) e corados com azul de toluidina para análise prévia em microscopia de luz e seleção das áreas para estudo ultra-estrutural. Os cortes ultra-finos de 70 a 80 nm foram obtidos em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT e coletados em telas de cobre de 150 mesh, contrastados com acetato de uranila 2% (Riedel-de Haenm, Alemanha) durante 20 minutos e citrato de chumbo (Ecibra, Brasil) a 0,5%, durante 10 minutos. As análises ultra-estruturais foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, LEO - EM902.

4. RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica.

Pela análise macroscópica identificaram-se áreas hiperêmicas na região mesometrial dos sítios submetidos à lesão embrionária a partir de 30 minutos pós-lesão e que se acentuavam para uma hemorragia localizada em 60 minutos pós-lesão. Parte dos sítios não lesionados encontrados ao longo do corno uterino esquerdo, apresentavam também áreas hiperêmicas na região mesometrial, sendo este fenômeno mais freqüente entre os sítios adjacentes aos lesados. Além da hiperemia da região mesometrial foram frequentemente encontrados sinais de extravasamento sanguíneo nas áreas de constrição lateral dos sítios, correspondentes aos segmentos de inter-implantação do útero. Na região antimesometrial onde foi realizada a lesão embrionária não foi constatada hemorragia localizada nos períodos analisados.

4.2 Avaliação morfológica através da citoquímica de lectina DBA.

4.2.1 Animais controles de gestação normal

Os cortes histológicos oriundos de animais de gestação normal submetidos à reação citoquímica com a lectina DBA foram utilizados para avaliação primária da distribuição das células uNK nos sítios de implantação embrionária, assim como para estabelecer as referências do padrão morfológico das células uNK, conforme preconizado por Paffaro Jr e colaboradores (2003).

Nos sítios de implantação embrionária de 9º dg, as células uNK lectina DBA positivas distribuíam-se exclusivamente na região mesometrial, ocupando tanto o estroma endometrial quanto infiltradas no miométrio (Fig. 1). A morfologia das células uNK baseada na reatividade com a lectina DBA apresentou variações características dos subtipos I, II, III e IV das células uNK relacionadas com os seus estágios de diferenciação no útero de camundongos prenhes (Figs. 2 a 5). Independentemente do estágio de maturação das células uNK, a lectina DBA apresentava constância de reação positiva na superfície celular, porém, com o avançar da maturação e presença dos grânulos citoplasmáticos, estes também apresentaram reação positiva (Figs. 2 a 5).

No 9º dg, os subtipos mais diferenciados (III e IV) encontravam-se predominantemente na área do endométrio decidualizado da região mesometrial próxima ao embrião, enquanto os subtipos I e II predominavam nas áreas junto ao miométrio, e na área intermediária do endométrio não decidualizado, entre o miométrio e o endométrio decidualizado, predominavam os subtipos II e III.

4.2.2 Animais submetidos à lesão embrionária

Na análise dos materiais submetidos à lesão embrionária não foram verificadas alterações histológicas na região mesometrial no período de 10 min pós-lesão, porém após 60 minutos foram encontradas áreas de extravasamento sanguíneo em meio ao estroma endometrial da região mesometrial. No embrião, foi constatado o colapso da membrana amniótica com infiltração de células sanguíneas no espaço do saco vitelino e desorganização dos tecidos embrionários, comprovando a lesão mecânica do embrião induzida pela introdução da agulha hipodérmica (Fig 6). As células uNK presentes na região mesometrial apresentavam padrão de marcação semelhante dos subtipos de maturação presente nos animais controle, junto com outras com alterações no padrão de marcação. Estas alterações no padrão de marcação das células uNK foram agrupadas em 3 categorias:

Categoria I (C-I): reação positiva descontínua na superfície celular e redução de marcação nos grânulos das células uNK (Fig 7).

Categoria II (C-II): reação fracamente positiva na superfície celular com presença de vesículas de dimensões variadas que apresentam halo periférico positivo e conteúdo negativo (Fig 8).

Categoria III (C-III): reação positiva descontínua na superfície celular, com grânulos parcialmente reativos à lectina e grandes áreas vesiculares no citoplasma sem qualquer marcação (Fig 9)

4.2.3 Padrão de distribuição das células uNK normais e alteradas nos períodos pós-lesão

No período de 10 minutos pós-lesão observaram-se células uNK presentes nas áreas do endométrio decidualizado com marcação positiva na superfície celular e com redução na intensidade de marcação dos grânulos. Estas alterações, classificadas como sendo C-I, apresentavam ainda as células uNK com o conteúdo citoplasmático DBA positivo finamente reticulado. Ao lado destas células uNK alteradas foram constadas as células uNK de aspecto normal do subtipo II, III e IV. Nas demais áreas do endométrio não decidualizado e no miométrio, as células uNK presentes não apresentaram alterações. As alterações representadas pela diminuição de intensidade na marcação dos grânulos e descontinuidade de membrana tornaram-se mais intensas após 30', quando, além de células uNK com alterações C-I, foram identificadas alterações C-II e C-III em uNK, ao lado de células normais do subtipo II e III em proporções menores que aquelas comumente encontradas em animais de gestação normal, presentes na área do endométrio decidualizado. Nas áreas do endométrio não decidualizado foram encontradas algumas uNK com alterações C-I, ao lado de células uNK normais dos subtipos I e II, enquanto, na região do miométrio, não foram identificadas células uNK com alterações de marcação, porém, constatou-se aumento no número de uNK do subtipo II nesta região.

No período de 60 minutos pós-lesão, nas áreas do endométrio decidualizado, as células uNK encontradas com maior freqüência, apresentaram alterações das categorias C-I, C-II, e C-III, ao lado de poucas células uNK normais do subtipo III e IV. Nas áreas do endométrio não decidualizado, algumas células uNK apresentaram alteração C-I e C-II ao lado da maioria de uNK normais do subtipo II e algumas do subtipo III. As células uNK infiltradas no miométrio apresentavam aspectos normais correspondentes aos subtipos I e II, com ligeiro aumento na incidência dos últimos.

Padrões de alterações semelhantes foram constatados em células uNK presentes nos sítios não lesionados adjacentes aos lesionados que apresentavam hiperemia na região mesometrial no período de 60 minutos pós-lesão. Nos sítios onde não ocorria hiperemia, não foram constatadas tais alterações morfológicas.

Nos materiais coletados do grupo controle observou-se a distribuição padrão das uNK, porém na área do endométrio decidualizado foram encontradas algumas células uNK com marcação descontínua ou fraca na superfície celular e grânulos citoplasmáticos positivos.

4.3 Análise ultra-estrutural

Nas análises ao microscópio eletrônico de transmissão, as quatro formas de maturação de células uNK de camundongos (Figs 10 a 13), presentes nas diversas áreas da região mesometrial foram facilmente identificadas pelas suas características ultra-estruturais descritas por Paffaro Jr e colaboradores (2003). Dentre as características, ressalta-se a presença do grânulo lisossomo-secretor com duplo compartimento, onde o capuz periférico mais eletrondenso constituído de microvesículas membranosas corresponde ao compartimento lisossomal e o compartimento central mais homogêneo e menos eletrondenso corresponde ao compartimento secretor (Fig 14).

Nos materiais procedentes de animais submetidos à lesão embrionária, a alteração mais freqüente observada foi a desestruturação dos grânulos das células uNK (Fig. 15). Nas primeiras alterações detectadas no período de 10 minutos, o compartimento secretor, ou "core", dos grânulos perdia o seu aspecto homogêneo, tornando-se floculento ou totalmente eletronlúcido, com descontinuidade na membrana do grânulo e descompactação das microvesículas da região do capuz do grânulo (Fig. 16). Nos períodos pós-lesão subseqüentes, foram encontrados grânulos cujo conteúdo do "core" apresentava-se parcial ou totalmente extraído e os grânulos freqüentemente fusionados (Figs. 17 e 18). No período de 60 minutos, foram encontradas ainda células uNK com amplo espaço intra-citoplasmático de contorno circular totalmente destituído de conteúdo, porém ao longo do perímetro destes espaços foram encontradas esparsas microvesículas membranosas que lembram os componentes do capuz dos grânulos lisossomo-secretores (Fig. 19). Ao lado destes grânulos desestruturados, sempre foram encontrados grânulos de aspecto normal no interior da mesma célula (Figs. 19 e 20). Nas análises dos materiais de até 60 minutos pós-lesão não foram encontradas imagens de fusão dos grânulos com a membrana plasmática, ou de continuidade dos grânulos de aspecto normal ou alterado com o meio extra-celular das uNK.

Células uNK contendo grânulos alterados eram mais evidentes entre aquelas presentes na área do endométrio decidualizado próxima ao embrião. Aquelas presentes junto ao miométrio não apresentaram tais alterações. As UNK do subtipo I, que não continham grânulos, não apresentaram diferenças em relação àquelas encontradas nas mesmas localizações dos sítios de animais controles. Apesar da desestruturação dos grânulos, as células uNK foram facilmente identificadas em meio às outras, pela

preservação das demais características ultra-estruturais. Não foram identificadas alterações na morfologia das células circunjacentes às uNK, que denotassem ruptura ou lise celular nas amostras analisadas.

4.4 Reações imunocitoquimicas

4.4.1 Catepsina-D

O anticorpo anti-catepsina D no útero de animais em gestação normal reagiu com as células uNK dos subtipos II a IV que apresentam grânulos lisossomo-secretores e que estão presentes no endométrio decidualizado e não decidualizado, porém, não reagiu com células uNK do subtipo I presente no miométrio, conforme identificado pela dupla marcação com a lectina DBA (Figs. 21a, b e 22a, b). Pela imunoperoxidase verifica-se que a reação positiva é predominantemente de aspecto areolar delimitando o perímetro dos grânulos (Fig. 23). Nas células uNK presentes no útero de animais com sítio embrionário lesionado, as reações com a anti-catepsina D mantiveram-se positivas no perímetro dos grânulos, enquanto nos períodos pós-lesão mais avançados, apresentavam halos mais amplos ou de aspecto aglutinado (Fig. 24).

Além das células uNK, as células trofoblásticas gigantes e as células deciduais e pré-deciduais da região antimesometrial apresentavam reações positivas puntiformes ou de pequenas vesículas nos seus citoplasmas (dados não mostrados).

4.4.2 Perforina

A reação imunocitoquímica com o anticorpo anti-perforina realizada no útero gestante normal, apresentou reação positiva no citoplasma das células uNK dos subtipos II, III e IV (Figs 25b, e, h), localizadas nas áreas do endométrio decidualizado e não-decidualizado. Através da dupla marcação com a lectina DBA, constatou-se que nem todos os grânulos lectina DBA positivos eram perforina positivos (Fig. 25c), assim como, nem todas as células uNK apresentavam grânulos perforina positivos.

Nos animais submetidos à lesão embrionária, verificou-se redução da proporção de células uNK contendo grânulos perforina positivos no período de 10 min pós-lesão. Esta redução de marcação era evidente nas áreas do endométrio decidualizado e atingia maior número de células uNK nos períodos subseqüentes (Figs 25d, e, f). Na área do endométrio não-decidualizado foi observado um ligeiro incremento de células uNK

perforina positivas no período de 1 hora pós-lesão, se comparado com o período de 30 minutos (Figs. 25g, h, i).

4.5 Citoquímica ultra-estrutural com azul cuprolínico

Nos animais de gestação normal, a citoquímica com azul cuprolínico mostrou reação positiva nos grânulos das uNK com variações de intensidade e distribuição no interior dos grânulos (Figs 26-29). Foram encontradas marcações em padrão filamentoso distribuídos uniformemente no conteúdo do "core" do grânulo e em graduações intermediárias até grânulos que não apresentaram qualquer reatividade (Figs.27-29). Na região do capuz não foi identificada reação positiva ao azul cuprolínico.

Nos animais submetidos à lesão embrionária, foram encontrados grânulos com padrões de marcações filamentosas semelhantes aos do grupo de animais de gestação normal em meio a outros grânulos com graus variados de desestruturação, cujos conteúdos da região do "core" apresentavam-se extraídos e sem reatividade ao azul cuprolínico (Figs. 30-33). Alguns grânulos cujo conteúdo da região do "core" apresentava-se pouco eletrondenso, assim como em grânulos que se encontravam em coalescência, não foram encontradas marcações regulares ou intensas (Figs. 31-33).

A proporção de células uNK que apresentavam reatividade negativa ao azul cuprolínico aumentou com o decorrer do período pós-lesão, com incidência maior na área do endométrio decidualizado e rara naquelas células presentes na área do miométrio.

5. DISCUSSÃO

A alta incidência da célula *Natual Killer* uterina (uNK) na interface materno fetal tem sido relacionada com a sua atividade imunomoduladora da gestação afetando o sucesso da implantação embrionária, consolidação da placentação e do desenvolvimento fetal (Guimond *et al.*, 1999; King, 2000). Tais papeis estão relacionados a produção de diversas citocinas que sustentam a gestação normal (Gambel *et al.*, 1985; Ashkar & Croy, 1999; Moffet-King, 2002).

O modelo experimental da lesão embrionária induzida mecanicamente utilizado neste trabalho, parte do pressuposto que anomalias envolvendo o embrião poderiam desencadear a resposta imediata das células uNK presentes neste ambiente, à semelhança do envolvimento destas células na resposta imune inata, uma vez que, teriam participação fundamental na proteção do organismo materno contra uma possível agressão das células trofoblásticas, (Stewart, 1984; Peel, 1989; Croy, 1994; Head., 1996). Este modelo experimental foi utilizado anteriormente por Roman (2001), que constatou a ocorrência de áreas de hemorragia na região mesometrial dos sítios embrionários lesionados, em experimentos que avaliaram o efeito de 1 a 24 horas pós-lesão.

No presente trabalho foram avaliados os efeitos da lesão embrionária no intervalo de até 1 hora, tendo sido constatada a ocorrência de hiperemia na região mesometrial dos sítios de implantação embrinária lesionados. A hiperemia ocorreu já aos 10 min. pós-lesão configurando um efeito agudo da lesão embrionária e que se acentuou com o decorrer do período pós-lesão, tendendo para uma hemorragia localizada nesta região. À semelhança do que foi descrito por Roman (2001), esta hiperemia/hemorragia atingiu também os sítios adjacentes não lesionados, confirmando também um efeito sistêmico, além de agudo no ambiente uterino.

A localização da área da hiperemia coincide com a do agregado linfocitário mesometrial da gravidez (MLAP), isto é, o local onde se acumulam transitoriamente as células NK durante a gestação (Croy, 1999). De fato, as análises realizadas com a citoquimica de lectina DBA revelaram o acúmulo das células uNK na região mesometrial tanto de animais em gestação normal, quanto nas amostras procedentes de animais submetidos à lesão embrionária, tendo sido identificados os 4 subtipos de maturação com distribuições preferenciais entre o endométrio decidualizado, não decidualizado e

miométrio da região mesometrial, à semelhança do que foi descrito por Paffaro Jr e colaboradores (2003). De acordo com estes autores, os subtipos menos diferenciados de uNK (subtipos I e II) estavam localizados predominantemente no miométrio e na base da inserção do mesométrio, enquanto as formas mais diferenciadas (subtipos III e IV) estavam distribuídas predominantemente no endométrio decidualizado próximo ao embrião. A correlação entre o envolvimento das células uNK e a hemorragia foi estabelecida por Roman (2001), que descreveu a ocorrência de células uNK com padrões de reatividade alterada para lectina DBA, sugerindo o envolvimento destas células com a hemorragia localizada e a lesão dos embriões ou dos fetos.

Dentre as alterações, ressaltam-se as células com redução ou ausência na marcação pela lectina DBA no citoplasma. De acordo com Paffaro Jr e colaboradores (2003), a marcação pela lectina DBA no citoplasma ocorre no conteúdo granular. Desta forma, a ausência da marcação pode ser interpretada como sendo conseqüência da perda do conteúdo granular pelas células uNK, como provável reposta às alterações do microambiente uterino induzida pela lesão embrionária.

Cumpre ressaltar que as alterações encontradas nas células uNK obedecem uma dinâmica onde as células plenamente diferenciadas que contêm grande quantidade de grânulos, classificadas como sendo de subtipo III e IV e presentes no endométrio decidualizado, são as primeiras que perdem a marcação dos grânulos pela lectina DBA, diferentemente daquelas menos diferenciadas dos subtipos I e II presentes no miométrio ou no endométrio adjacente a este, que preservam seu conteúdo. Com o avançar do tempo pós-lesão, as células uNK presentes na área do endométrio não decidualizado também apresentam redução na marcação dos grânulos, o que é sugestivo de um recrutamento progressivo das células presentes nestas áreas. A distribuição das células uNK obedece uma graduação regionalizada, onde células menos diferenciadas estão presentes nas áreas mais próxima ao miométrio e as mais diferenciadas junto ao endométrio decidualizado mais próximo ao embrião (Paffaro Jr *et al.*, 2003).

Por conseguinte, a ocorrência de um gradiente de células uNK fenotipicamente alteradas que se difunde progressivamente do endométrio decidualizado em direção ao miométrio nos animais submetidos à lesão embrionária, sugere fortemente que a lesão no embrião induz inicialmente uma mobilização em curto espaço de tempo (menor que 10 minutos) de células uNK subtipo III e IV plenamente diferenciadas e portanto aptas a

responderem instantaneamente ao estímulo exógeno. A continuidade do estímulo, isto é, o embrião lesionado presente no ambiente uterino, induz a mobilização perceptível dentro de 60 minutos pós-lesão dos subtipos II e I.

A produção e acúmulo de grânulos citolíticos contendo perforina nas uNK têm sido diretamente relacionados com o estadio de maturação destas células (Croy *et al.*, 2003, Paffaro Jr *et al.*, 2003), o que poderia ser estimulado e acelerado em resposta a perda de homeostase no ambiente uterino.

Nas análises ultra-estruturais dos sítios lesionados um fato notório é a presença de células uNK com os seus grânulos citoplasmáticos apresentando alteração da forma e perda do seu conteúdo eletrondenso. Isto é, enquanto nas células uNK presentes no útero durante a gestação normal os grânulos apresentam a sua forma peculiar de duplo compartimento (Parr *et al.*, 1990; Paffaro Jr *et al.*, 2003), os grânulos das células presentes nos sítios lesionados apresentam contornos irregulares com descontinuidade da membrana, com o capuz periférico de microvesículas membranosas apresentando um arranjo menos compacto e o conteúdo do "core" pouco eletrondenso ou nitidamente extraído.

Tanto as células NK quanto as CTL apresentam os grânulos lisossomo-secretores (Burkhardt *et al.*, 1990; Peters *et al.*. 1991; Bossi & Griffiths, 1999). Presume-se que ambos os compartimentos atuem em conjunto para desencadear a ação citolítica sobre as células alvo (Burkhardt *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1992 a,b; Nakajima & Henkart, 1994; Nagata & Gostein, 1995; Bossi & Griffits, 1999). Dentre os conteúdos dos grânulos, a proteína lítica perforina é a mais característica como efetora principal na indução da lise das células alvos (Herberman *et al.*, 1986., Rukavina *et al.*,2000). Esta proteína presente no "core" granular, uma vez liberada através da exocitose (Peters *et al.*, 1991; Trapani, 1998; Rukavina *et al.*, 2000; Stepp *et al.*, 2000), insere-se diretamente na membrana plasmática da célula alvo e ao se agrupar em complexos multiméricos forma lesões tubulares na membrana plasmática, com conseqüente interrupção de continuidade da mesma (Peters *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1995; Rukavina *et al.* 2000; Stepp *et al.*, 2000).

Na análise correlativa de imagens, a desestruturação com perda de conteúdo dos grânulos observados em microscopia eletrônica, deve corresponder àquelas imagens das células uNK alteradas, cuja reatividade para com a lectina DBA era reduzida ou ausente no citoplasma, quando observada em microscopia de luz.

A reação com o anticorpo anti-perforina demonstrou a imuno expressão nos grânulos citoplasmáticos das células uNK presentes no útero gestante normal. O fato desta reatividade mostrar-se drasticamente reduzida nas uNK dos sítios lesionados é sugestivo da perda de perforina, com possível liberação através da exocitose. Por outro lado, a reação predominantemente no perímetro dos grânulos pela anti-catepsina D é consistente com a constituição dos grânulos das uNK, onde o capuz periférico é o domínio do compartimento lisossomal. Esta marcação periférica não foi alterada significativamente nas uNK dos sítios lesionados, sugerindo um comprometimento menor do compartimento lisosomal durante a desestruturação dos grânulos.

As alterações da composição e forma dos grânulos lisossomo-secretores das células uNK foram constadas também através da citoquímica ultra-estrutural para o conteúdo de proteoglicanos, com o emprego de azul cuprolínico que reage com glicosaminoglicanos dos proteoglicanos (Scott, 1988; Schumacher & Adam, 1994). Os resultados revelam a presença de proteoglicanos nos grânulos lisossomo-secretores das uNK presentes no útero durante a gestação normal, porém esta reatividade reduziu-se ou tornou-se totalmente negativa nos grânulos das uNK dos animais que tiveram sítios embrionários lesionados.

A presença de proteoglicanos em grânulos foi descrita em diversas células da linhagem hematopoiética (Kolset & Gallanger, 1990). Os proteoglicanos, em especial os serglicins, têm sido descritos nos grânulos das células citotóxicas (Schimidt *et al.*, 1985; Masson *et al.*, 1990; Raja *et al.*, 2002; Raja *et al.*, 2003). As cargas negativas dos proteoglicanos em meio ao pH ácido promovem a ligação de moléculas catiônicas com a compactação do conteúdo dos grânulos sendo um eficiente meio de estocagem destas moléculas (Kolset *et al.* 2004). Além disso, a ligação eletrostática com os proteoglicanos em pH ácido mantêm as moléculas citolíticas, como a perforina ou as proteases, inativas no interior dos grânulos celulares, sendo liberadas do complexo e tornado-se bioativas somente no meio extra-celular em pH alcalino (Masson *et al.*, 1990, Kolset *et al.*, 2004). Nos grânulos das células citotóxicas (NK e CTL), os proteoglicanos apresentam uma propriedade adicional onde o complexo proteoglicano-perforina-granzima formado é funcionalmente mais efetivo na indução da apoptose das células alvo do que a perforina ou a granzima isoladamente (Raja *et al.*, 2002 e 2003).

Desta forma, a redução ou perda da marcação pelo azul cuprolínico nos grânulos das uNK em animais com sítios lesionados sugere a perda de proteoglicanos dos grânulos. O fato de ocorrer a redução na marcação com perforina nestes mesmos períodos, sugere fortemente a ocorrência de degranulação das uNK em resposta à lesão embrionária.

Contudo, nas extensivas análises ultra-estruturais não foram constatadas imagens representativas da ocorrência de exocitose nas uNK. Isto é, não foram encontrados grânulos com contigüidade com o meio extra-celular que caracterizassem uma secreção do tipo merócrina. Além disso, como conseqüência direta da extensiva degranulação por exocitose do conjunto de células uNK presentes na área do endométrio decidualizado, se ativado todo o seu potencial citolítico, deveria resultar na degeneração de todos os tecidos desta área. Também não se conhece quais possíveis inibidores poderiam estar presentes neste ambiente uterino que promovessem a supressão das ações citolíticas. Os períodos de experimentos pós-lesão utilizados no presente trabalho, que se estenderam somente até 1 hora, não permitiriam acompanhar o efeito de tal ação citolítica, porém, mesmo nos experimentos de Roman (2001) que observou até 24 horas pós-lesão, não há relatos de tal ocorrência.

Pela incidência específica na gestação e a localização estratégica das uNK na interface materno-fetal, postula-se que os potenciais alvos da ação citolítica destas células seriam as células trofoblásticas, em um mecanismo de contenção da sua invasividade ou para eliminar trofoblastos aberrantes (Stewart, 1984; Head, 1996). De fato, as células cNK são capazes de lisar células alvos que não expressam ou que apresentem alterações no complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I ou HLA (human leukocyte antigen) anômalos. Porém, no caso das células trofoblásticas, este mecanismo não seria efetivo pelo fato dessas células expressarem apenas HLA-E e HLA-G que são ligantes dos receptores inibitórios da atividade lítica (KIR) das células NK e não as ativadoras da ação lítica (Loke & King, 2000). Além disso, as células uNK não expressam a molécula CD16, que é o receptor responsável pelo desencadeamento da citotoxidade mediada por células dependente da expressão de imunoglobulinas como ligante (Rukavina *et al.*, 2000; Loke & King, 2000). Por conseguinte, as uNK presentes no ambiente uterino durante a gestação normal apresentam o mecanismo necessário para

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

reconhecer e tolerar o trofoblasto que reveste integralmente o embrião, não ativando qualquer mecanismo citolítico espontaneamente.

Os nossos resultados evidenciaram que células uNK cujos grânulos se alteram em decorrência da lesão embrionária, não realizam migrações para atingir células alvos, como as células trofoblásticas ou o próprio embrião, sendo evidente a permanência nos locais onde a princípio elas estavam no útero normal.

Esta aparente imobilidade das uNK com perda do conteúdo citolítico dos grânulos, sob o efeito do embrião lesionado, contradiz com o paradigma do mecanismo da ação citotóxica das NK. Isto é, as células cNK, assim como o linfócito T citotóxico (CTL) são contato-dependentes na promoção da exocitose do seu conteúdo granular. A liberação deste conteúdo no espaço intercelular entre a célula citotóxica e a célula alvo permite a atuação sinérgica de perforina, granzimas e enzimas lisosomais, resultando na penetração destas moléculas no citoplasma e núcleo da célula alvo (Peters *et al*, 1991; Trapani, 1998).

Há dois mecanismos que desencadeiam eventos citotóxicos, tanto em CTL quanto em células NK, que resultam na indução da apoptose da célula alvo (Blink *et al.* 1999). O primeiro é a via dependente de Fas, que envolve ligação na superfície celular de Fas/Fas ligante para estimular a sinalização de uma cascata enzimática dentro da célula alvo, levando-a a morte. As células NK utilizam predominantemente a via da exocitose do conteúdo granular que envolve a liberação controlada de conteúdos granulares na superfície celular da célula alvo. Esta via da exocitose após contato, presume a migração das uNK para junto da célula alvo em potencial para promover o contato físico, o que aparentemente não ocorre neste modelo experimental de lesão embrionária.

Conforme salientado anteriormente, as análises ultra-estruturais não mostraram imagens representativas da ocorrência de exocitose nas uNK dos sítios lesionados e as células do estroma endometrial encontradas ao redor das uNK aparentemente não sofreram a ação citolítica ou citotóxica. Por estes resultados, embora algumas evidências apontem para a ativação do potencial citolítico das células uNK, outros não confirmam tal ação.

Estas observações sugerem para as uNK um mecanismo alternativo, não convencional de exocitose, na modulação das suas atividades no útero gestante, inclusive na liberação do conteúdo citolítico dos seus grânulos.

Por outro lado, algumas células da linhagem hematopoética atuantes em respostas inflamatórias tais como eosinófilos e mastócitos, apresentam um mecanismo de liberação de citocinas e mediadores químicos através do processo denominado *piecemeal degranulation* (PMD) (Erjefält *et al.*, 1988; Lacy, 1998; Dvorak, 1998; Logan *et al.*, 2003, Crivellato *et al.*, 2003). Este processo consiste na liberação de pequenas vesículas contendo mediadores e citocinas originárias dos grânulos secretores, podendo esvaziar o conteúdo destes grânulos, sem que ocorra a exocitose do mesmo (Crivellato *et al.*, 2003). De acordo com Crivellato e colaboradores (2003), em mastóciros e eosinófilos o volume dos grânulos que sofreram o processo de PMD, na maioria das vezes expandem na medida em que o seu conteúdo se esvazia, podendo ocorrer ainda fusão destes grânulos. Além disso, os grânulos que sofrem este processo podem coexistir com grânulos normais na célula ativada.

Estas observações do processo de PMD são muito semelhantes àquelas encontradas nos grânulos das células uNK pós-lesão, sugerindo a ocorrência deste processo nestas células.

A função imunomoduladora das uNK é promovida através da síntese e secreção de inúmeras citocinas, tais como o IFN-γ e VEGF (vascular endothelial growth factor) (Croy *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Ashkar *et al.*, 2000) e mediadores químicos como o óxido nítrico (NO) (Wang *et al.*, 2000, Burnett & Hunt, 2000). Não há relatos se estes mediadores são armazenados nos grânulos da uNK e no presente experimento não foram realizados estudos que permitam esta comprovação, porém, a expressão de VEGF e NO pelas células uNK e sua possível liberação em níveis elevados podem estar relacionados com a hiperemia que ocorre na região mesometrial imediatamente após a lesão embrionária.

Pelas análises realizadas neste experimento não se pode determinar qual fator primário tem a capacidade para induzir as alterações nos grânulos das uNK, ou se esta alteração está diretamente relacionada com a hiperemia observada nos sítios embrionários. Esta interpretação torna-se particularmente difícil em se tratando do ambiente uterino gestante que apresenta uma complexa rede de diálogos entre células e células-citocinas. Porém, o modelo de lesão embrionária mostrou uma dinâmica de resposta do ambiente uterino que envolve a participação das células uNK em mecanismos ainda pouco esclarecidos. Estudos aprofundados utilizando este modelo

experimental deverão auxiliar na compreensão destes mecanismos de atuação, contribuindo na elucidação de alguns dos mecanismos que resultam na interrupção de gestação.

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos no presente experimento, pode-se concluir que:

1) A lesão embrionária em camundongos provoca reação hiperêmica na região mesometrial dos sítios embrionários a partir de 10 minutos pós-lesão, a qual se intensifica com o decorrer do período pós-lesão.

2) As alterações nas células uNK decorrente da lesão embrionária são verificadas inicialmente nos subtipos mais diferenciados já aos 10 minutos pós-lesão, caracterizando uma resposta aguda e imediata destas células frente à anormalidade do ambiente uterino provocada pela lesão do embrião.

3) As formas menos diferenciadas das uNK são rapidamente mobilizadas no seu processo de maturação sob o estímulo da lesão embrionária.

4) As alterações nas células uNK mais proeminentes foram a perda do conteúdo dos grânulos citoplasmáticas e descontinuidade da marcação na superfície celular pela lectina DBA.

5) A desestruturação dos grânulos acomete tanto o compartimento lisosomal quanto o secretor. Porém, a manutenção da reatividade à catepsina D sugere que o compartimento lisosomal embora afetado, mantenha a sua atividade funcional.

6) A perda do conteúdo nos grânulos lisossomo-secretores das uNK acomete fundamentalmente o compartimento secretor 10 minutos após a lesão. Esta perda se acentua com o decorrer do período pós-lesão e sugere a degranulação do complexo perforina-proteoglicano.

7) Apesar da aparente perda do conteúdo citolítico dos grânulos, não houve evidências de uma lise generalizada das células adjacentes às células uNK alteradas.

8) Embora as células uNK possuam um arsenal citolítico nos grânulos e seja verificada a sua perda, não está confirmada a ocorrência da exocitose clássica como mecanismo de liberação deste conteúdo.

7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 1 – Fotomicrografia de um corte transversal do sítio de implantação embrionária de camundongo no 9ºdg normal. Notar a distribuição de células uNK na região mesometrial, ocupando a área do miométro (m), do endométrio não-decidualizado (e) e do endométrio decidualizado (d). Embrião (E) ocupando a região antimesometrial. Reação citoquímica com lectina DBA. Barra = 300µm.

Figuras 2 a 5 – Fotomicrografias mostrando detalhe de células uNK dos sub-tipos I a IV, respectivamente. Notar a reação positiva com lectina DBA na superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos. G = área do Complexo de Golgi. Barra = 5µm.

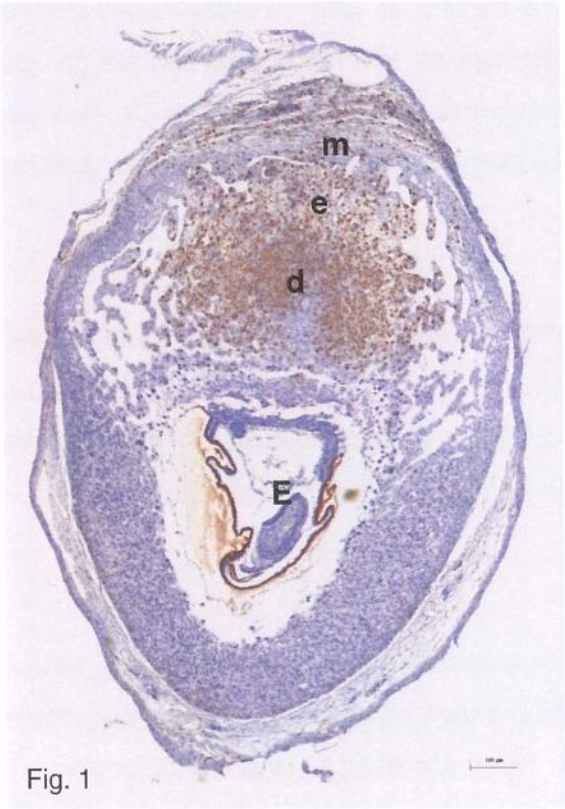

Fig. 1

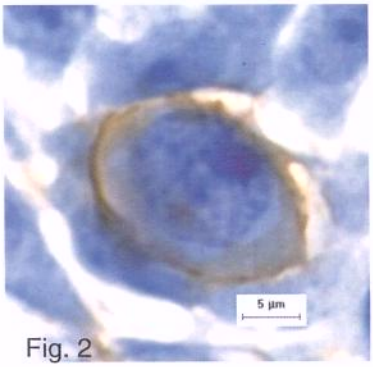

Fig. 2

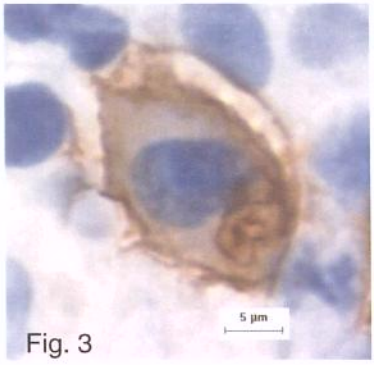

Fig. 3

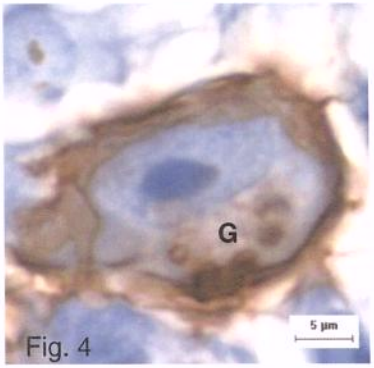

Fig. 4

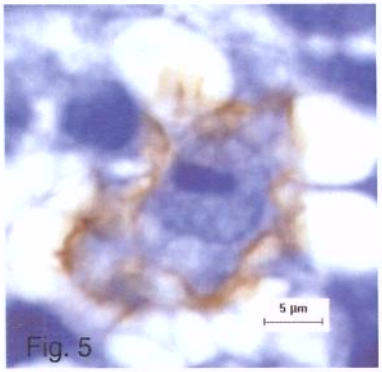

Fig. 5

Figura 6 – Fotomicrografia de sítio de implantação embrionária no 9º dg após 30 min. da lesão. Observar ruptura da membrana amniótica (seta) e as células uNK distribuídas na região mesometrial ocupando a área do miométro (m), endométrio não decidualizado (e), endométrio decidualizado (d). Reação citoquímica com lectina DBA. Barra = 300µm.

Figura 7 – Fotomicrografia mostrando detalhe da célula uNK presente no sítio embrionário lesionado (10 minutos pós-lesão) na área do endométrio decidualizado, com alteração de Categoria I. Notar a fraca marcação na superfície celular e redução na intensidade de marcação dos grânulos citoplasmáticos. Reação citoquímica com lectina DBA. Barra = 5µm.

Figura 8 - Fotomicrografia mostrando detalhe da célula uNK presente no sítio embrionário lesionado (30 minutos pós-lesão) na área do endométrio decidualizado, com alteração de Categoria II. Notar a marcação positiva descontínua na superfície celular e o padrão areolar no perímetro das vesículas (setas), algumas confluentes, presentes no citoplasma. Reação citoquímica com lectina DBA. Barra = 5µm.

Figura 9 - Fotomicrografia mostrando detalhe da célula uNK presente no sítio embrionário lesionado (30 minutos pós-lesão) na área do endométrio decidualizado, com alteração de Categoria III. Notar a marcação positiva descontínua na superfície celular e o padrão areolar no perímetro de vesículas confluentes (setas) presentes no citoplasma. Algumas vesículas (v) apresentam-se totalmente negativas e destituídas de conteúdo. Reação citoquímica com lectina DBA. Barra = 5µm.

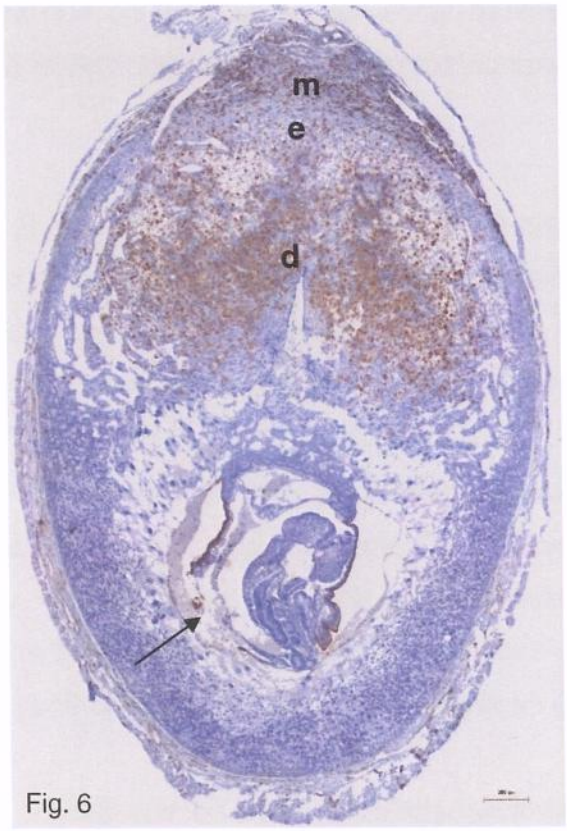

Fig. 6

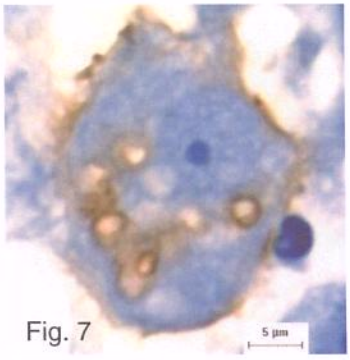
Fig. 7

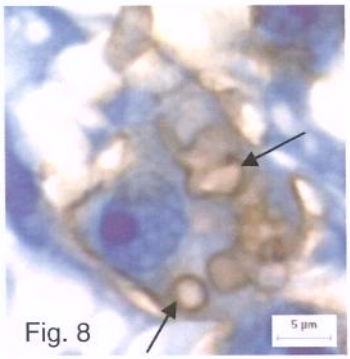
Fig. 8

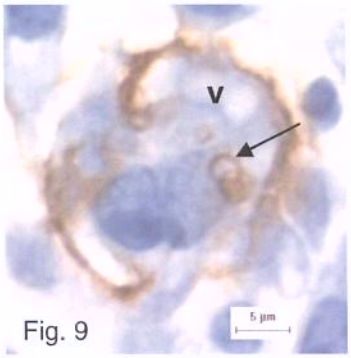

Fig. 9

Figura 10 – Eletromicrografia de célula uNK do sub-tipo I, semelhante a um linfócito, sem grânulos. Área do miométrio da região mesometrial de útero no 9º dg normal. Barra = 1,5 μm.

Figura 11 – Eletromicrografia de uNK do sub-tipo II, exibindo núcleo com cromatina pouco condensada e nucléolo evidente. Citoplasma com poucas organelas membranosas e alguns grânulos lisossomo-secretores (g). Área do endométrio não decidualizado da região mesometrial do útero no 9º dg normal. Barra = 3,5 μm.

Figura 12 – Eletromicrografia de uNK do sub-tipo III, com núcleo contendo cromatina pouco condensada. Citoplasma com retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi desenvolvidos. Notar o maior número de grânulos de duplo compartimento (g) característico em seu citoplasma. Área do endométrio decidualizado com células deciduais (d) na região mesometrial do útero no 9º dg normal. Barra = 3,5 μm.

Figura 13 – Eletromicrografia de uNK do sub-tipo IV, exibindo grânulos de contorno irregular e com variações na eletrodensidade (*). Notar núcleo com cromatina descondensada. Área do endométrio decidualizado com células deciduais (d) na região mesometrial do útero no 9º dg normal. Barra = 6,0 μm.

Figura 14 - Eletromicrografia mostrando detalhe do grânulo lisossomo-secretor de uma célula uNK do sub-tipo III, evidenciando o duplo compartimento com a área do capuz de microvesículas membranosas (v) e o compartimento central mais homogêneo e menos eletrondenso (*). Barra = 1,0 μm.

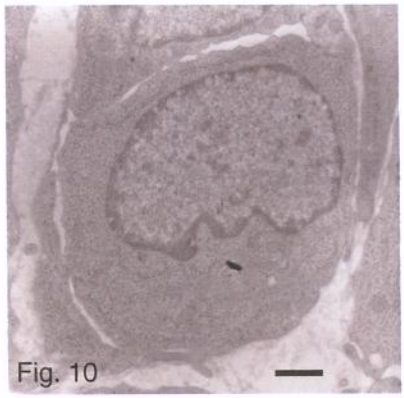

Fig. 10

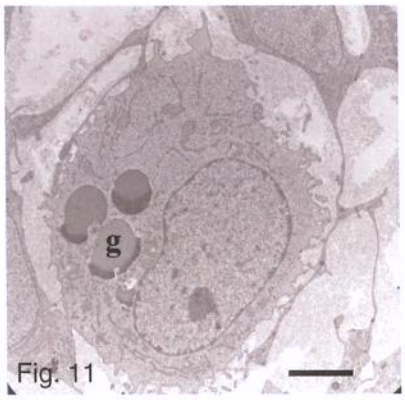

Fig. 11

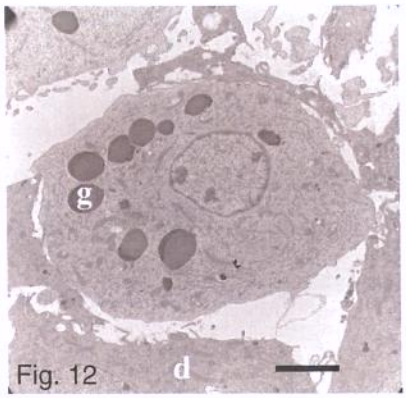

Fig. 12

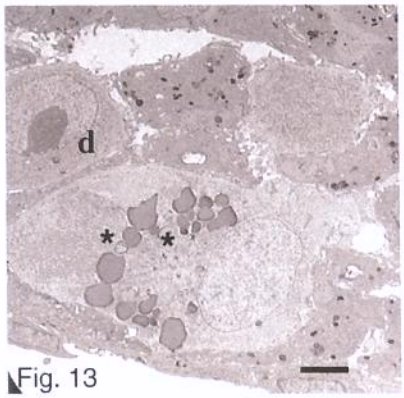

Fig. 13

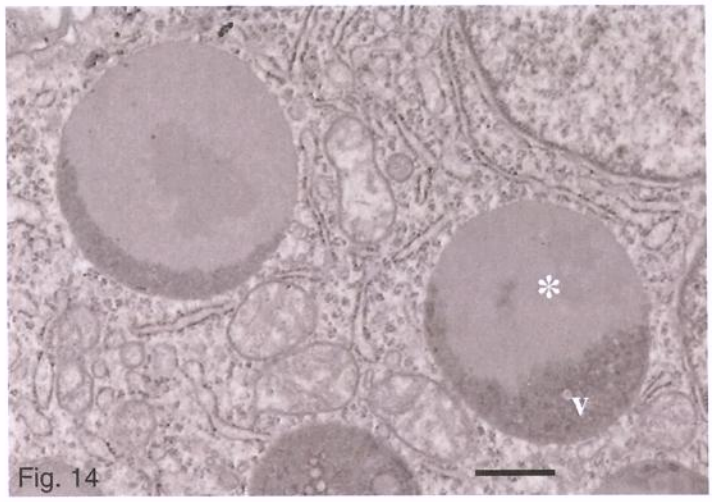

Fig. 14

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Figura 15 - Eletromicrografia de uNK do sub-tipo III, presente na área do endométrio decidualizado de sítio de implantação embrionário lesionado. Notar a presença de vários grânulos desestruturados (setas) eletrotranslúcidos ao lado de outros de morfologia aparentemente inalterada. Barra = 4,5 μm.

Figura 16 – Eletromicrografia de grânulos íntegros (g) ao lado de um grânulo alterado exibindo descontinuidade na membrana (seta), descompactação e evasão das microvesículas do capuz (v) e região secretora eletronlúcida (*). Área do endométrio decidualizado de sítio de implantação embrionário lesionado. Barra = 0,7 μm.

Figuras 17 e 18– Eletromicrografias de grânulos alterados e fusionados (f) exibindo as áreas do compartimento central nítidamente extraídas e pouco homogêneas (*). Áreas do endométrio decidualizado de sítio de implantação embrionário. Barras = 2,6 μm e 0,8 μm, respectivamente.

Figura 19 – Eletromicrografia de área citoplasmática com grânulos remanescentes (*) sem delimitação por membrana, ao lado de um grânulo de morfologia normal (g). Área do endométrio decidualizado de sítio de implantação embrionário lesionado. Barra = 1,5 μm.

Figura 20 – Eletromicrografia de uNK do sub-tipo III contendo grânulos com diferentes alterações (setas) e outros de morfologia intacta (g). Área do endométrio decidualizado de sítio de implantação embrionário. Barra = 3,5 μm.

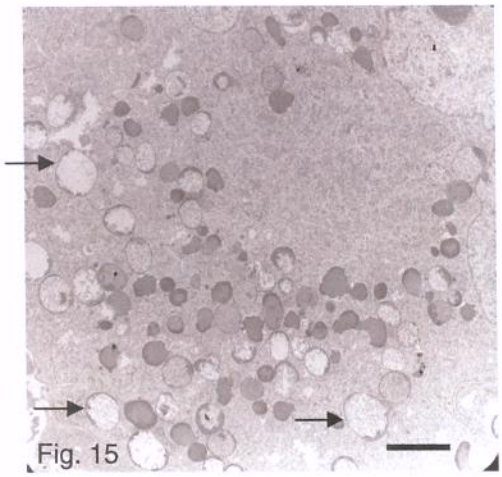

Fig. 15

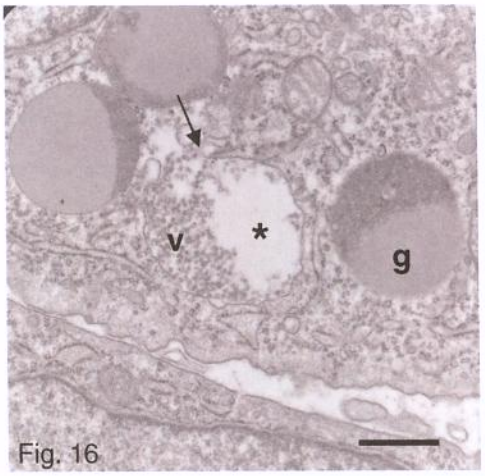

Fig. 16

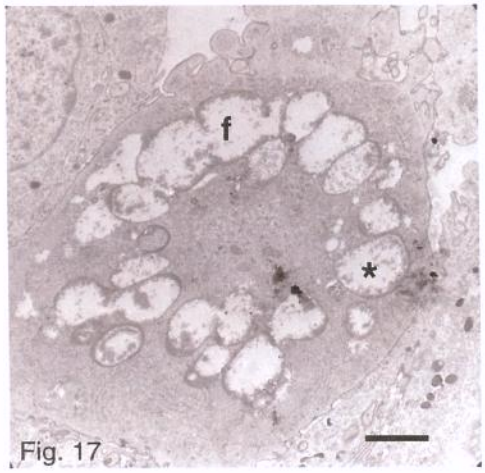

Fig. 17

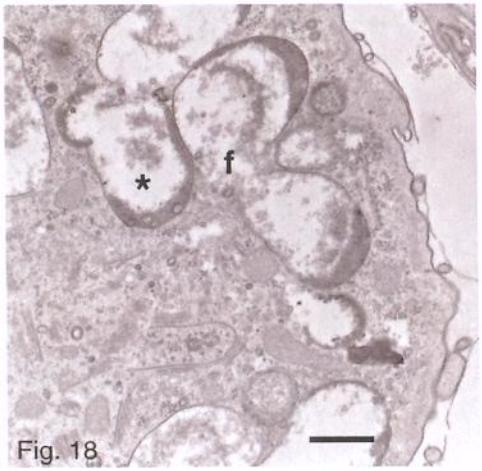

Fig. 18

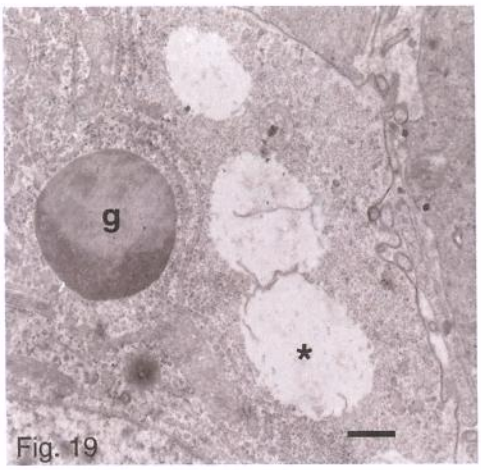

Fig. 19

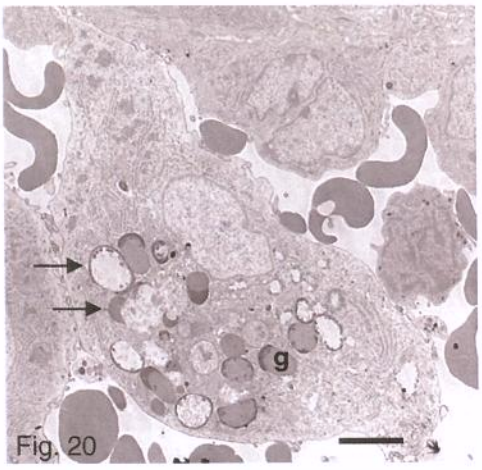

Fig. 20

Figuras 21a e 21b – Microscopia de fluorescência em área do miométrio da região mesometrial do utero no 9º dg normal, mostrando dupla-marcação de células uNK do sub-tipo I lectina DBA positiva (fig. 21a) e anti-catepsina D negativa (fig 21b). Barra = 100µm.

Figuras 22a e 22b – Microscopia de fluorescência em área do endométrio não decidualizado da região mesometrial do útero no 9º dg normal, com dupla marcação de células uNK dos sub-tipos II e III. Notar a reação lectina DBA positiva na superfície celular e nos grânulos (fig. 22a) e anti-catepsina D positiva (fig. 22b) nos grânulos das mesmas células. Barra = 100µm.

Figuras 23 e 24 – Fotomicrografias de reação por imunoperoxidase com anti-catepsina D. Observar reação positiva em forma de halos no citoplasma, junto ao perímetro dos grânulos da célula uNK de animal normal (fig. 23). Nas uNK de sítios após 30 min. da lesão (fig. 24), o padrão areolar se mantém nos grânulos que aparentam coalescência. Barra = 10µm.

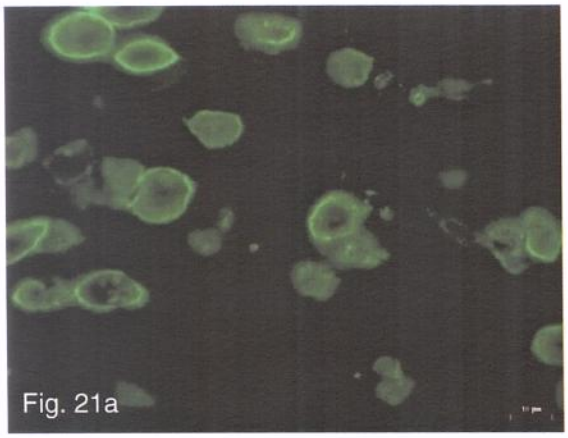

Fig. 21a

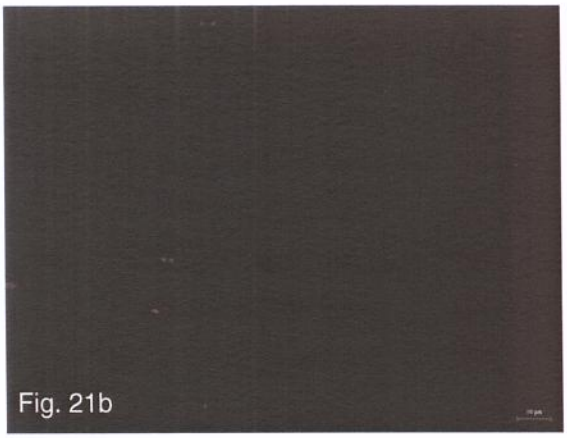

Fig. 21b

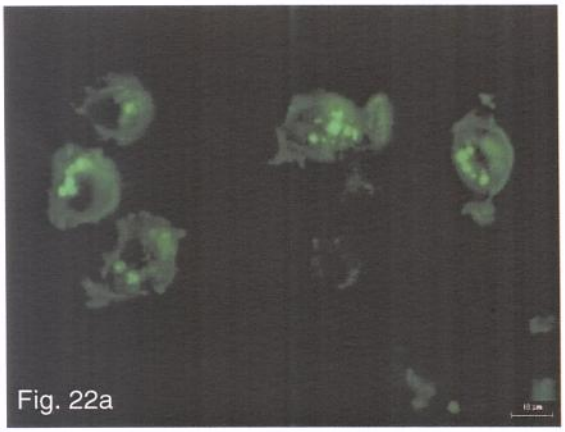

Fig. 22a

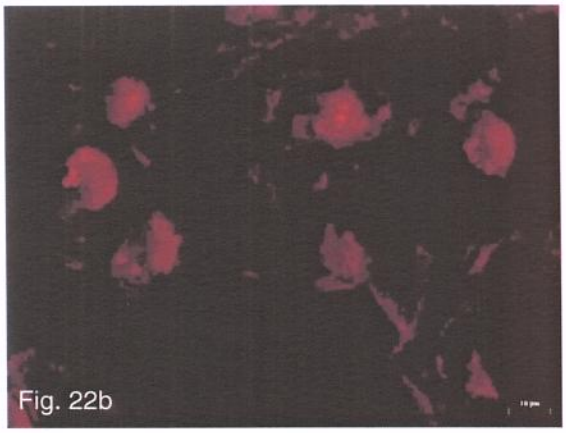

Fig. 22b

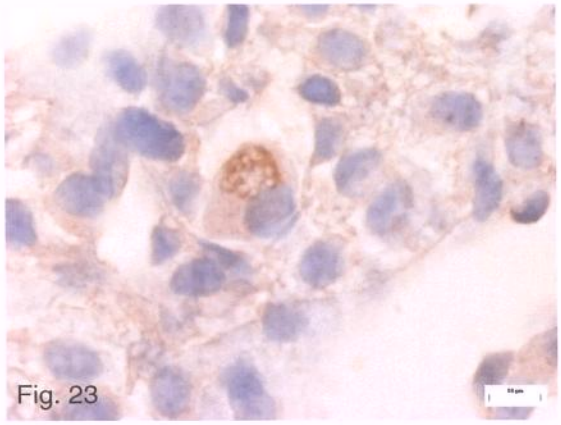

Fig. 23

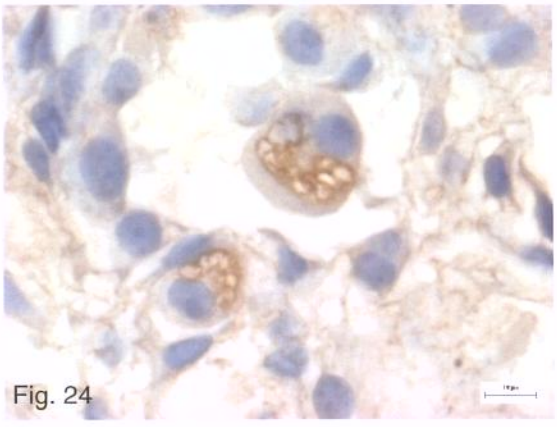

Fig. 24

Figura 25 a-i – Microscopia de fluorescência com reação citoquímica para lectina DBA (a,d,g) e imunocitoquímica para anti-perforina (b,e,h) e colocalização DBA/perforina (c,f,i) em células uNK localizadas na área do endométrio decidualizado de útero em gestação normal (a,b,c) e após 30 minutos de lesão (d,e,f) apresentando uma drástica redução na reatividade tanto para a anti-perforina quanto para a lectina DBA. No período de 60 minutos pós-lesão, algumas células uNK localizadas na área do endométrio não-decidualizado apresentam reatividade para lectina DBA e fraca reatividade para a anti-perforina (g,h,i). Barra = 10µm.

Fig. 25 a

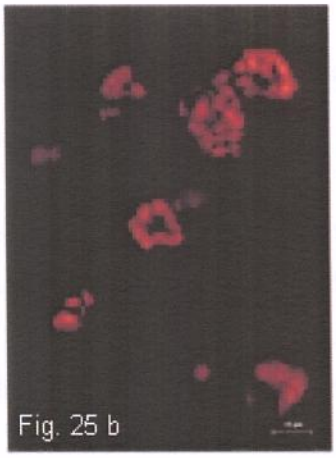

Fig. 25 b

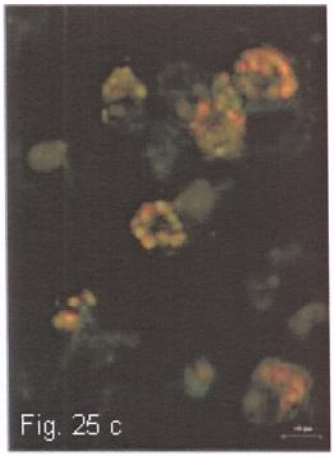

Fig. 25 c

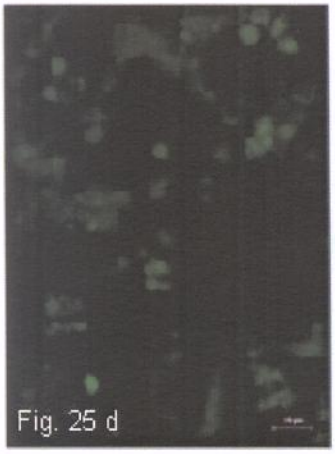

Fig. 25 d

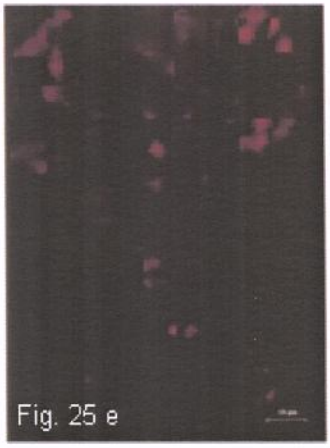

Fig. 25 e

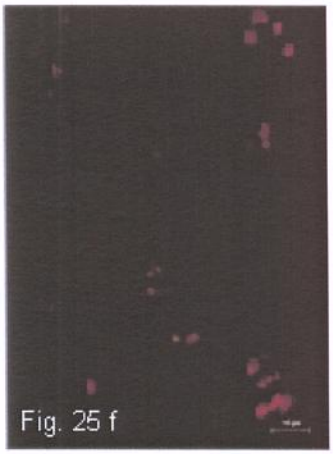

Fig. 25 f

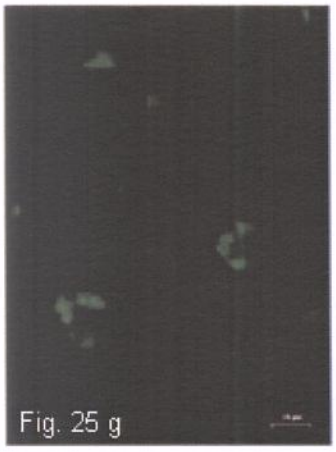

Fig. 25 g

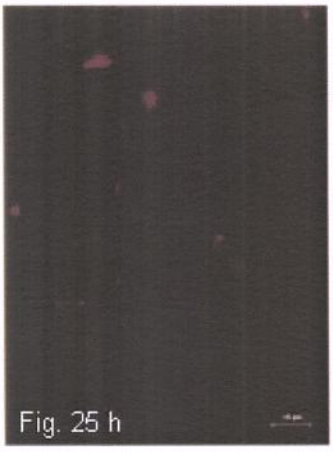

Fig. 25 h

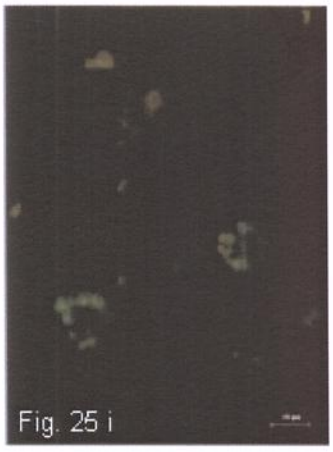

Fig. 25 i

Figura 26 – Eletromicrografia de reação citoquímica com azul cuprolínico em animais normais, com presença de proteoglicanos distribuidos na área central dos grânulos. Notar as diferenças de intensidade na marcação entre os grânulos na mesma célula uNK. Barra = 1,0μm.

Figuras 27 a 29 – Eletromicrografias mostrando detalhes de grânulos lisossomo-secretores de células uNK de animais em gestação normal submetidos à reação citoquímica de azul cuprolínico. Observar variações no padrão de organização e compactação de proteoglicanos na mesma célula (fig. 26). Há grânulos cujo conteúdo é negativo (fig. 27) para o azul cuprolínico ou pouco reativo (fig. 28) e outros intensamente positivos (fig. 29). Barras = 260 nm , 336 nm e 336 nm, respectivamente.

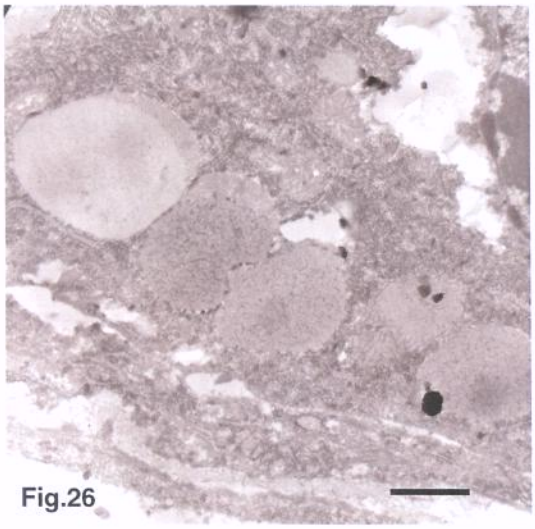

Fig.26

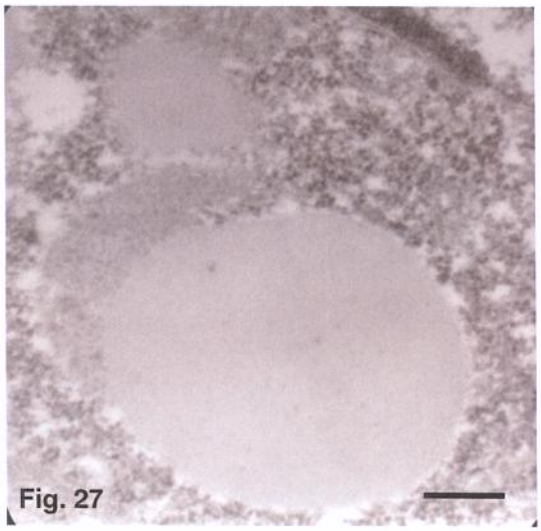

Fig. 27

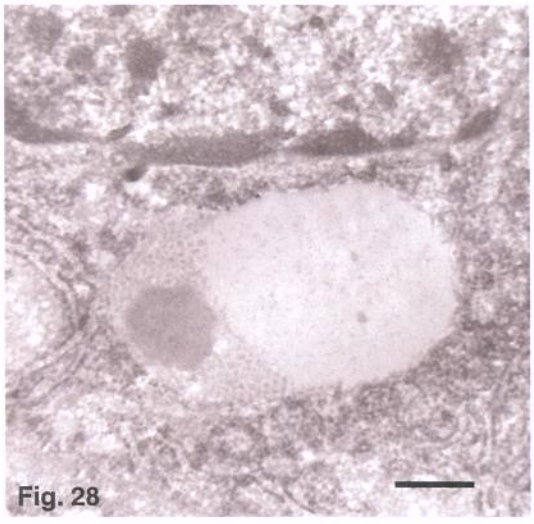

Fig. 28

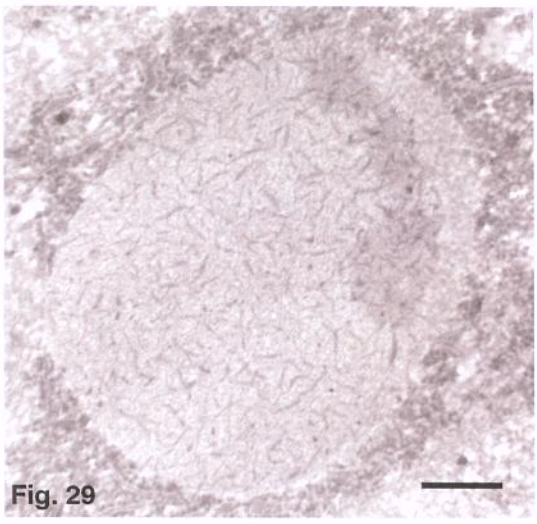

Fig. 29

Figuras 30 a 33– Eletromicrografias de células uNK, procedentes de animais com lesão embrionária, submetidas à reação citoquímica com azul cuprolínico. Notar que a região central da maioria dos grânulos mostra redução na intensidade de reação com o azul cuprolínico, sendo comum a presença de grânulos totalmente negativos (fig 31), lado a lado com outros que mantêm o conteúdo de proteoglicanos (fig. 32). Alguns grânulos apresentam distribuição pouco homogênea no compartimento central, sendo as áreas mais eletrondensas mais reativas ao azul cuprolínico. Barras = 1,5 μm (fig. 30) e 0,9 μm (Fig. 31 a 33).

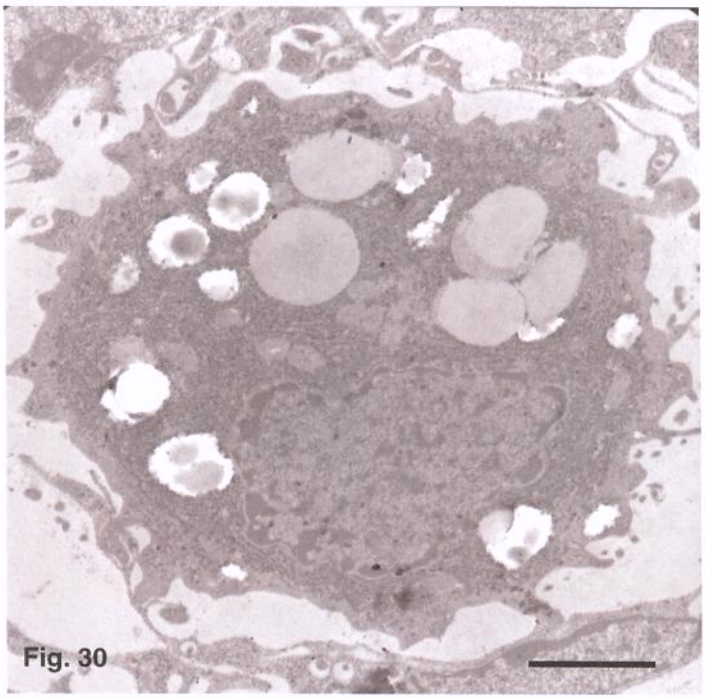

Fig. 30

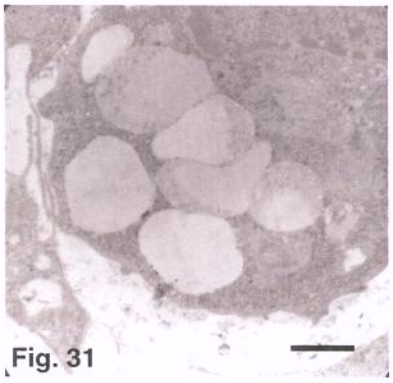

Fig. 31

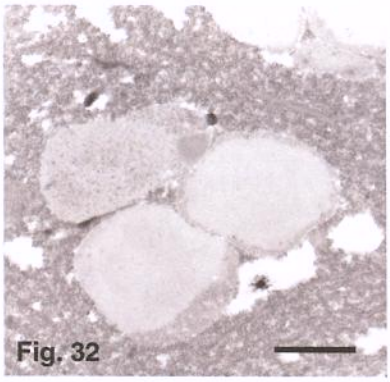

Fig. 32

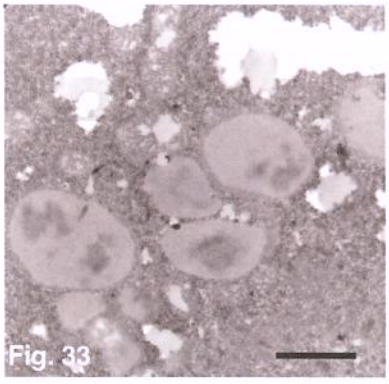

Fig. 33

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. and POBER, J. S. Imunologia Celular e Molecular, Quarta edição, cap 12. Tradução de Raymundo Martagão Gesteira, Livraria e Editora Revinter Ltda, RJ, Brasil 544p, 2000.

ASHKAR A. and CROY B. A. Interferon-γ contributes to the normalcy or murine pregnancy. **Biology of reproduction,** v.61, p.493-502, 1999.

BARANOV V.; NAGAEVA O.; HAMMARSTRÖM S and MINCHEVA-NILSSON L. Lipids are a constitutive component of cytolytic granules. **Histochem cell biol,** v.114, p.167-171, 2000.

BOSSI, G. and GRIFFITHS, G. M. Degranulation plays an essential part in regulating cell suface expressin of Fas ligant in T cells and natural killer cells. **Nat. Med.,** v.5, p.90-96, 1999.

BULMER, D. Further studies on the granulated metrial gland cells of the pregnant rat. **J. Anat.**, v.103, p.479-489, 1968.

BULMER, J. N. and LASH, G. E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Molecular Immunology,** v.42, p.511-521, 2005.

BURKHARDT, J. K.; HESTER, S.; LAPHAM, C. K. and Argon, Y. The lytic granules of NK cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysossomal compartments. **J. Cell Biol.,** v.111, p.2340-2340, 1990.

BURNETT, T. G. and HUNT, J. S. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. **J. Immunol,** v.15, p.5245-5250, 2000.

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

CLARCK, R. and GRIFFITHS, G. M. Lytic granules, secretory lysosomes and disease. **Curr. Opin. Immunol.,** v. 15, p.516-521, 2003.

CORRÊA DA SILVA, C. R.; JOAZEIRO, P. P.; YOKOTA, S. and YAMADA, A. T. Granules of endometrial NK-like cells show a specific lysossomal compartment. **Acta Histochem. Cytochem.**, v.29, p.487-488, 1996.

CHANTAKRU. S.; MILLER, C.; ROACH, L. E.; ZUZIEL, W. A.; MAEDA, N.; WANG, W. C.; EVANS, S. S. and CROY B. A. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. **J. Immunol.,** v.168, p.22-28, 2002.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; TURNER, S. C.; CHEN, K. S.; GHAHERI, B. A.; GHAYUR, T.; CARSON, W. E.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood,** v.97, p.3146-51, 2001.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; MALLARDI, F.; BELTRAMI, C. A.; RIBATTI, D. Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? **Anat Rec A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.**, v. 274(1), p.778–784, 2003.

CROY, B. A. Granulated metrial gland cells: hypoteses concerning possible functions during murine gestation. **J. Reprod. Immunol.,** v. 27, p.85-94, 1994.

CROY, B. A. The 1999 Reginal Thomson Lecture. Custom-built mice: unique discovery tools in biomedical research. **Can. Vet. J.,** v.41, p.201-206, 1999.

_____; DI SANTO, J. P.; GREENWOOD, J. D.; CHANTAKRU, S. and ASHKAR, A. A.; Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy--a review. **Placenta,** v.21(A), p.S77-80, 2000.

_____; ESADEG, S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO, V. A.; HE, H.; BLACK, G. P.; ASHKAR, A. A.; KISO, Y. and ZHANG, J. Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral

arteries and homing of their precursors to the uterus. **J. Reprod. Immunol.**, v.59, p.175-191, 2003.

_____; GAMBEL, P.; ROSSANT, J. and WEGMANN, T. G. Characterization of murine decidual natural killer (NK) cells and their relevance to the success of pregnancy. **Cell. Immunol.,** v.93, p.315-326, 1985.

_____; HE H.; ESADEG S.; WEI Q.; McCARTNEY D.; ZHANG J.; BORZYCHOWSKI A.; ASHKAR A. A.; BLACK G.P.; EVANS S.S.; CHANTAKRU S.; VAN DEN HEUVEL M.; PAFFARO JR V.A. and YAMADA A.T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction,** v.126, p.149-160, 2003.

_____ and KISO, Y. Granulated metrial gland cells, a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. **Microsc. Res. Tech.,** v.25, p.189-200, 1993.

DELGADO, S. R.; McBEY, B. A.; YAMASHIRO, S. FUJITA, J.; KISO, Y. and CROY, B. A. Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population from the pregnant mouse uterus. **J. Leuk. Biol.**, v.59, p.262-269, 1996.

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

DVORAK, A. M. A role for vesicles in human basophil secretion cell **Tissue Res**, v.293, p.1-22, 1998

ERJEFÄLT, J. S.; ANDERSSON, M.; GREIFF, L.; KORSGREN, M.; GIZYCKI, M.; JEFFERY, P. K., PERSON, G. A. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. **J Allergy Clin Immunol**, v.102 (2), p.286-94, 1998

GAMBEL, P.; CROY, B. A; MOORE, W. D.; HUNZIKER, R. D.; WEGMANN, T. G. and ROSSANT, J. Characterization of immune effector cells present in early murine decidua. **Cell Immunol**., v. 93, p.303-314, 1985.

GRIFFITHS, G. M. Protein sorting and secretions during CTL killing. **Semin. Immunol.,** v.9, p.109-115, 1997.

GUIMOND, M. J.; LUROSS, J. A.; WANG, B.; TERHORST, C.; DANIAL, S. and CROY B. A. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. **Biol. Reprod.,** v.56, p.169-179, 1997.

GUIMOND, M.; WANG B. and CROY B. A.. Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficiente tgε26 mice. **J. Exp. Med.,** v.187, n.2, 217-223, 1998.

_____; WANG, B. and CROY B. A. Immune competence involving the natural killer cell lineage promotes placental growth. **Placenta**, v.5-6, p.441-50, 1999.

HATTACHOTE P, GILLESSPIE J. I. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. **Endocrinology**, v.140 n.6, p.2433-40, 1999.

HEAD, J. R. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. **Nat. Immun.**, v.97, p.7-21, 1996.

HERBERMAN, R. B. Natural killer cells. **Annu. Rev. Med.,** v.37, p.347-352, 1986.

KING, A.; WOODING, P.; GARDNER, L. and LOKE Y. W. Expression of perforin, granzyme A and B by human uterine $CD56^+$ NK cells implies they are actived and capable of effecter functions. **Human Reprod.**, v.8, p.2061-2067, 1993.

KING, A.; HIBY, S. E.; GARDNER, L.; JOSEPH, S.; BOWEN, J. M.; VERMA, S.; BURROWS, T. D. and LOKE, Y. W. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors - a review. **Placenta**, v.21(A), p.S81-5, 2000.

KOLSET, S. O. and GALLANGER, J. T. Proteoglycans in haemopoietic cells. **Biochem. Biophys. Acta,** v.1032, p.191-211, 1990.

_____; PRYDZ, K. and PEJLER, G. Intracellular proteoglycans. **Biochem. J.**, v. 379 (2), p.217-227, 2004.

KOOPMAN, L. A.; KOPCOW, H. D.; RYBALOV, B.; BOYSON, J. E.; ORANGE, J. S.; SCHATZ, F.; MASCH, R.; LOCKWOOD, C. J.; SCHACHTER, A. D.; PARK, P. J. A. and STROMINGER, J. L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J. Exp. Med.,** v.198, p.1201-12, 2003.

KURAGO, Z. B.; LUTZ, C. T.; SMITH, K. D. and COLONNA, M. NK cell cytotoxicity and IFN-gamma production are not always coordinated: engagement of DX9 KIR^+ NK cells by HLA-B7 variants and target cells. **J. Immunol.**, v.160, p.1573-1580, 1998.

LACY, P.; MAHMUDI-AZER, S.; BABLITZ, B.; HAGEN, S.C.; VELAZQUEZ, J.R.; MAN, S.F.; MOQBEL, R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. **Blood**, v.94(1), p.23-32, 1999.

LEHMANN, C.; ZEIS, M. and UHAREK, L. Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. **Br. J. Haematol.,** v.114, p.660-665, 2001.

LEWIS, V.; GREEN, S. A.; MARSH, M.; VIHKO, P.; HELENIUS, A. and MELLMAN, I. Glycoproteins of the lysosomal membrane. **J. Cell Biol.,** v.100, p.1839-1847, 1985.

LIN, K. J., ODUKOVA, O. A., AIJAN, R. A., LI, T. C., WEETMAN, A. P., COOKE, I. D. The role of T-helper cytokines in human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 73 (1), p.136-42, 2000.

LIU, C.; WALSH, C. M and YOUNG, J. D. Perforin: structure and function. **Immunol. Today,** v.16, p.194-201, 1995.

LOGAN, M. R.; ODEMUYIWA, S. O. and MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflamatory cells: the molecular basis of mediator secretion. **J. Allergy Clin Immunol,** v.111, p.923–932, 2003.

LOKE, Y. W. and KING, A. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? **Biochem Soc Trans.**, v. 28(2), p.196-198, 2000.

MASSON, D.; PETERS, P. J.; GEUZE H. J.; BORST, J. and TSCHOPP, J. Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzyimes of citolytic T cells is dependent of pH. **Biochemistry,** v.19, p.11229-11235, 1990.

METKAR, S. S.; WANG, B.; AGUILAR-SANTELISES, M.; RAJA, S. M.; UHLIN-HANSEN, L.; PODACK, E.; TRAPANI, J. A. and FROELICH C. J. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. **Immunity**, v.16(3), p.417-428, 2002.

MIDDLETON, D.; CURRAN, M. and MASWELL, L. Natural Killer cells and their receptors. **Transpl. Immunol.,** v.10, p.147-164, 2002.

MILLER, J. S. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. **Experim. Hematol.,** v.29, p.1157-1168, 2001.

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

NAGATA, S. and GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science,** v.10, p.1449-1456, 1995.

NAKAJIMA, H. and HENKART, P. A. Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. **J. Immunol.,** v.152, p.1057-1063, 1994.

PARR, E. L.; YOUNG, L. H.; PARR, M. B.; YOUNG, J. D.; Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **J. Immunol.,** v.145(7), p.2365-2372, 1990.

PAFFARO JR, V. A.; BIZINOTTO, M. C.; JOAZEIRO, P. P. and YAMADA, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**, v.24, p.479-488, 2003.

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

PETERS, P. J.; BORST, J.; OORSCHOT, V.; FUKUDA, M.; KALENBUHL, O.; TSCHOPP, J.; SLOT, J. W. and GENZE, H. J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzimes. **J. Exp. Med.,** v.173(5), p.1099-1109, 1991.

RAJA, S. M.; METKAR, S. S. and FROELICH, C. J. Cytotoxic granule-mediated apoptosis. Unraveling the complex mechanism. **Curr. Opinion Immunol.**, v.15, p.528-532, 2003.

RAJA, S. M.; WANG, B.; DANTULURI, M.; DESAI, U. R.; DEMELER, B.; SPIEGEL, K.; METKAR, S. S. and FROELICH, C. J. Cytotoxic-cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. **J. Biol. Chem.,** v.277, p.49523-30, 2002.

ROMAN, S. S. Caracterização morfológica e comportamental das células NKu em camundongos após lesão embrionária nos diferentes períodos gestacionais. 2001, 99f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas.

RUKAVINA, D. and PODACK, E. R. Abundant Perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? **Immunolgy Today,** v.21, p.160-163, 2000.

SAITO, S., SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.** v. 59 n.2, p.161-73, 2003.

SCHIMDIT, R. E.; MACDERMOTT, R. P.; BARTLEY, G.; BERTOVICH, M.; AMATO, D. A.; AUSTEN, K. F.; SCHLOSSMAN, S. F.; STEVENS, R. L. and RITZ, J. Specific release of proteoglycans from human natural killer cells during target lysis. **Nature,** v.318, p.289-291, 1985.

SCHUMACHER, U. and ADAM, E. Standardization of staining in glycosaminoglycans histochemistry: alcian blue, its analogues and diamine methods. **Biotech. Histochem,** v.69, p.18-24, 1994.

SHI, L.; KRAUT, R. P.; AEBERSOLD, R. and GREENBERG, A. H. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. **J Exp Med.,** v175, p.553 - 566, 1992a.

SHI, L.; KAM, C. M.; POWERS, J.C.; AEBERSOLD, R. and GREENBERG, A.H. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interaction. **J Exp Med.**, v.176, p.1521 - 1529, 1992b.

SLUKVIN, I. I.; MERKULOVA, A. A.; VODYANEK, M. A. and CHERNYSHOV, V.P. Differential expression of CD45RA and CD45RO molecules human decidual and peripheral blood lymphocyte at early stage of pregnancy. **Am. J. Immunol.** v.35 (1), p.16-22, 1996.

STEWART, I. A morphological study of granulated metrial gland cells and trophoblast cells in the labyrinthine placenta of the mouse. **J. Anat,** v.139, p.627-638, 1984.

STEWART, I.and PEEL, S. The structure and differentiation of granulated metrial gland cells of the pregnant mouse uterus. **Cell Tiss. Res.**, v.184, p.517-527, 1977.

_____ and PEEL, S. Granulated metrial gland cells at implantation sites of the mouse uterus. **Anat. Embryol.**, v.160, p.227-238, 1980.

STEPP, S. E.; MATHEW, P. A.; BENNETT, M.; DE SAINT BASILE, G. and KUMAR, V. Perforin: more than just an effector molecule. **Immunol, Today,** v.21, p.254-256, 2000.

STINCHCOMBE, J. C. and GRIFFITHS, G. M. Regulated secretion from hemopoietic cells. **J. Cell Biol.,** v.147, p.1-5, 1999.

TRAPANI, J. A. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. **Int. Rev. Cytol.,** v.182, p.111-192, 1998.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv. Immunol**., v.47, p.187-376, 1989.

VASSILIADOU, N. and BUMER J. N. Function studies of human decidua in spontaneous early pregnancy loss: effect of soluble factors and purified $CD56^{+}$ lymphocytes on killing of NK- and lymphokine-activated killer sensitive targets. **Biol. Reprod.** v.58 (4), p.982-7, 1998.

VEUGELERS, K.; MOTYKA, B.; FRANTZ, C.; SHOSTAK, I.; SAWCHUK, T. and BLEACKLEY, R. C. The granziyme B serglycin complex from cytotoxic granules requires dynamin for endocytosis. **Blood,** 103(10), p.3845-3853, 2004.

WANG, C.; UMESAKI, N.; NAKAMURA, H.; TANAKA, Y.; NAKATANI, K.; SAKAGUCHI, I.; OGITA, S. and KENADA K. Expresion of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. **Cell Tissue Res.,** v.300, p.285-293, 2000.

ZENCLUSSEN, A. C.; GORLOF, K.; ZENCLUSSEN, M. L.; SOLLWEDEL, A.; BERTOJA, A. J.; RETTER, T.; KOTSCH, K.; LEBER, J. and VOLK, H. D. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnance – induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevent fetal rejection in murine abortion model. **Am. J. Pathol.** v.166 (3), p.811-22, 2005.

ZHENG, L. M. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immun.**, v.25, p.72-76, 1991.

ZHENG, L. M.; OJCIUS, P. M.; LIU, C. C.; SIMON, M. M.; PARR, E. L. and YOUNG, J. D. E. Immunogold labeling of perforin and serine eterases in granulated metrial gland cells. **FASEB Journal**, v.5, p.79-85, 1991.