



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Marcia Cristina Bizinotto

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS PARA MOLÉCULAS DE EXPRESSÃO ESPECÍFICA EM CÉLULAS NATURAL KILLER UTERINAS (NKu) DE CAMUNDONGOS

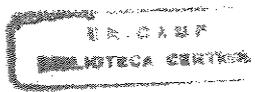
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Marcia Cristina Bizinotto aprovada pela Comissão Julgadora.

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

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada

Co-Orientador: Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro



UNIDADE	80
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	B5530
V.	Ex.
TOMBO BC	46902
PROC.	16.392/07
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	RS 11,00
DATA	02/11/07
N.º CPD	

CM00161051-1

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Bizinotto, Marcia Cristina

B55371 ♂ Obtenção de anticorpos para moléculas de expressão específica em células natural killer (NKu) de camundongos/Marcia Cristina Bizinotto.--
Campinas, SP:[s.n.], 2001
67f.:ilus.

Orientador: Aureo T. Yamada

Co-Orientadora: Wirla M.S.C. Tamashiro

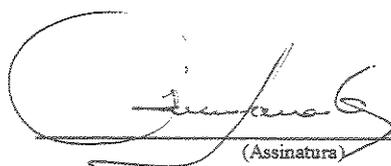
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Células killer. 2. Anticorpos. 3. Receptores. 4. Reprodução. I. Yamada, Aureo T. II. Tamashiro, Wirla M.S.C. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da defesa: 13/08/2001

Banca Examinadora

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)


(Assinatura)

Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn


(Assinatura)

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


(Assinatura)

Prof. Dr Paulo Pinto Joazeiro

(Assinatura)

*Agradeço a DEUS
pelo milagre da vida.*

“ Ainda que eu falasse a língua dos homens, que eu falasse a língua dos anjos, sem Amor eu nada seria...”

(I Cor 13:1)

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Conceição, os responsáveis pelo que sou. Obrigado por todo amor e carinho !

AGRADECIMENTOS

À Wilson, Gislaine, Cláudio e Marcio, meus irmãos, por fazerem parte da minha vida. À Juliana, Gabriel, Livia, Juliano, Izabela, Izadora e Yago, meus amados sobrinhos, pelo carinho e constante alegria. À todos da minha família por estarem sempre comigo.

Ao Juvenal pela paciência, pelo constante incentivo nos momentos finais deste trabalho e principalmente pelo amor e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela oportunidade e confiança à mim concedidas, pela amizade, incentivo e por toda dedicação empenhada na minha formação científica e acadêmica.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Wirla. M. S. C. Tamashiro, pela imensa colaboração e apoio, principalmente na fase experimental deste trabalho.

Ao curso de Pós Graduação em Morfologia, posteriormente reestruturada junto ao programa de Biologia Celular e Estrutural- área de concentração em Histologia do Instituto de Biologia, UNICAMP por ter me recebido como aluna.

Aos membros da pré-banca, Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, Profa. Dra Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela leitura da versão inicial da tese e sugestões para o aprimoramento da mesma.

Ao laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica e ao laboratório de Criométodos e Embriologia Experimental do Departamento de Histologia e Embriologia - IB/UNICAMP, onde foi realizada a maior parte dos experimentos.

Ao Biotério SPF do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB/UNICAMP, que abrigou parte dos animais utilizados nos experimentos.

Ao laboratório de Inflamação e Imunologia Celular do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB/UNICAMP onde foi realizada parte dos experimentos.

Aos meus amigos Elisa, Éder, Rosa, Zé, Marissol, Andréa, Claudia, Willian, Verônica, Wantuid, Lenira, Marcina, Dr. Reinaldo, Renato, pela amizade, carinho, e incentivo.

Ao meu amigo Fábio por me ajudar a se preparar para o exame de Mestrado, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos Humberto e Reginaldo, pelo carinho e pelo ombro amigo nos momentos difíceis de minha vida.

Aos meus colegas de pós-graduação Débora, Fabíola, Monique, Alex, Eliane,

Luciana, Vânia, Débora Coraça, Celina, Priscila, Mariana, Gustavo, pela colaboração, pelos momentos alegres e convivência diária.

Aos meus amigos Junior e Silvane, pelas gargalhadas, carinho, apoio e constante incentivo.

À Suzana pela amizade sincera e pela presença em tantas horas de desabafo.

À Profa. Miralva da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, pelos ensinamentos, estímulo, pelo incentivo e carinho.

À Profa. Dra. Gláucia Pastore da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo estímulo, apoio e colaboração.

À Profa. Dra. Júlia do Departamento de Microbiologia e Imunologia/UNICAMP, pela colaboração.

Aos Docentes do Departamento de Histologia e Embriologia - IB/UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas e científicas, em especial, ao Prof. Dr. Luiz Antônio Violin, ao Prof. Dr. Paulo Joazeiro e à Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon, pela amizade, carinho, auxílio didático, companheirismo e principalmente pelo incentivo constante.

À Patrícia, Loren, Márcia, Vani e Adriana do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB/UNICAMP, pelo carinho, amizade, incentivo e valiosa colaboração.

Aos funcionários Baltazar, Claudinete e Cleusa do Departamento de Histologia e Embriologia – IB/UNICAMP pela amizade, convivência e colaboração diária.

Às secretárias Helena, Rita e Beatriz, do Departamento de Histologia e Embriologia – IB/UNICAMP e Lillian e Sidnei, do Departamento de Biologia Celular – IB/UNICAMP, pelo apoio em diversos momentos.

Aos funcionários Martinha, Marta, dona Raquel e seu Antônio pela convivência, auxílio técnico e colaboração diária.

Aos funcionários Marcos e Dirce, do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB/UNICAMP, pela inestimável colaboração, determinante no sucesso deste trabalho.

Aos camundongos, cujas vidas foram dadas para a realização deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão da bolsa.

À todos que direta ou indiretamente me ajudaram a alcançar este objetivo.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	ii
AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - Características gerais das células NK uterinas	02
1.2 - Natural Killer X Natural Killer uterinas. Semelhanças e diferenças	04
1.3 - Hipóteses	08
2 - OBJETIVOS	10
2.1 – Objetivo geral	11
2.2 - Objetivos específicos	11
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 - Animais	13
3.2 - Coleta e processamento histotécnico	13
3.2.1 – Fixação por perfusão e embebição em parafina	13
3.2.2 – Citoquímica de lectina DBA	14
3.3 – Isolamento das células NK-u pelo método biomagnético	14
3.4 – Imunização dos animais e obtenção de anticorpos monoclonais	16
3.4.1 – Protocolo de imunização de camundongos	16
3.4.1.1 – Inoculação intraesplênica	16
3.4.1.2 – Inoculação intraperitoneal	16
3.4.1.3 – Etapas de imunização	16
3.4.2 – Obtenção de hibridomas	17
3.4.2.1 – Preparo da camada de macrófagos peritoneais de camundongos (<i>feeder-layer</i>)	17
3.4.2.2 - Preparo das células de mieloma	18
3.4.2.3 - Obtenção e preparo das células esplênicas	18
3.4.2.4 - Fusão celular	18
3.4.2.5 - Seleção dos hibridomas	19

3.4.2.6 – Clonagem das culturas de hibridomas	19
3.4.2.7 - Expansão e criopreservação dos hibridomas	20
3.4.2.8 - Determinação dos isotipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais	21
3.4.2.9 - Produção de ascite	21
3.5 - Testes imunocitoquímicos e imunoquímicos	21
3.5.1 - Método imunocitoquímico	21
3.5.1.1 - Reação de imunofluorescência indireta em células NK-u isoladas	21
3.5.1.2 - Reação de imunofluorescência indireta em cortes histológicos	22
3.5.2 - Método imunoquímico	23
3.5.2.1 - Obtenção de homogenados	23
3.5.2.2 - SDS-PAGE	23
3.5.2.3 - <i>Western blotting</i>	23
4 – RESULTADOS	25
4.1 - Citoquímica da lectina DBA	26
4.2 - Isolamento de células NK-u	26
4.3 - Imunização de camundongos	26
4.4 - Obtenção de hibridomas contendo anticorpos anti-Nk-u	27
4.5 - Indução de ascite para produção de anticorpos monoclonais	29
4.6 - Testes imunocitoquímicos e imunoquímicos	30
5 – DISCUSSÃO	31
6 – CONCLUSÕES	38
7 - DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	40
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMO

Durante a gestação de roedores é observado, na região mesometrial de cada sítio de desenvolvimento embrionário, um acúmulo transitório de células linfocitárias da linhagem *natural killer* (NK). Estas células Natural Killer de ambiente uterino (NK-u) apesar de expressarem antígenos de superfície semelhante as demais Nk, não desencadeiam a atividade citolítica como as Nk de sangue circulante. Este comportamento peculiar não foi ainda explicado o que vem dificultando a compreensão das possíveis participações destas células na imunologia da reprodução.

A citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutín*), tem sido utilizada para a marcação seletiva das células NK-u de camundongos. Uma vez que esta lectina não reage com outros linfócitos, os glicoconjugados reativos a lectina DBA, localizados na superfície das NK-u, poderiam ser moléculas específicas desta linhagem celular. Porém estes glicoconjugados não foram ainda isolados ou caracterizados.

Neste trabalho, propôs-se a obtenção de anticorpos específicos para o reconhecimento de células Nku de camundongos além de procurar identificar moléculas de expressão específica destas células. Para tanto as células NK-u, isoladas de úteros de camundongos prenhes foram utilizadas como inóculo antigênico em machos da mesma espécie. Apenas um dentre os seis camundongos imunizados produziu anticorpos que reagiram com as células NK-u, por meio de testes imunocitoquímicos. Do animal receptor que apresentou resposta imune, produzindo anticorpos reativos às células NK-u, foram obtidos os linfócitos esplênicos empregados na obtenção de hibridomas através da fusão com células tumorais. Quatro hibridomas foram selecionados para a obtenção de líquido ascítico contendo anticorpos monoclonais. A especificidade dos anticorpos obtidos foi avaliada por métodos imunocitoquímicos e imunoquímicos (*western blotting*).

Entre os quatro clones selecionados (2C6.2B9, 2C6.2E4 2C4.1C10 e 2C4.5A10), dois apresentaram marcação tanto na superfície quanto no conteúdo citoplasmático das NK-u (2C4.1C10, 2C4.5A10), enquanto os outros dois marcaram apenas o conteúdo citoplasmático (2C6.2B9, 2C6.2E4). Pelos testes imunoquímicos realizados, os anticorpos produzidos pelos clones 2C4.1C10 e 2C4.5A10 identificaram bandas de 52,0 KDa e 53,8 KDa e os anticorpos dos clones 2C6.2B9 e 2C6.2E4 identificaram uma

banda de 41,4 KDa, que apresentam correspondência com bandas positivas à lectina DBA.

O fato da imunização intraespécie, com o uso de células NK-u inteiras ter resultado na produção de anticorpos contra estas células, torna-se a primeira evidência direta de que as células NK-u fazem parte de uma linhagem específica da gestação, as quais expressam moléculas exclusivas, reconhecidas como "non-self" pelos machos da mesma espécie.

Dentre os clones de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais aqueles que reconhecem estruturas de superfície das células NK-u podem ser utilizados como potenciais marcadores dessas células em camundongos, uma vez que reconhecem glicoconjugados também reativos à lectina DBA, que seriam expressos exclusivamente por estas células.

ABSTRACT

During the pregnancy in the rodents a transient accumulation of natural killer (NK) cells is seen in the uterus. These cells found in the uterine environment express the surface antigen common to circulating NK (cNK) cells, but they do not show some cytokine receptors and do not trigger the cytolytic activity during normal pregnancy. Such a peculiar behavior of uNK cell has not been fully explained and their role in the immunology of reproduction is still unclear.

It has been reported the use of DBA (*Dolichos biflorus*) lectin cytochemistry for selective staining of mouse uNK cell. Since this lectin does not react with other lymphocytes, the glycoconjugates reactive to DBA lectin localized on uNK cell surface could be specific molecules of such a cell lineage. However, the glycoconjugates reactive to DBA lectin have not been isolated or characterized yet.

The present work was proposed to obtain antibodies specific against mouse uNK cell and looking identify molecules of specific expression for. In this aim, the whole uNK cells isolated from pregnant mice uterus were used as antigen and male mice of same strain, as host. From the animal producing antibodies against mouse uNK cell were collected the spleen and further processed to isolate the lymphocytes clones producing the monoclonal antibody (mAb) and the hybridomas of four clones were produced the ascites. The specificities of antibodies were evaluated by immunocytochemistry and immunoblotting.

Only one among six immunized mice produced antibody against mouse uNK cells evaluated by immunocytochemistry. Four clones showing two different labeling pattern by immunocytochemistry were chosen to obtain ascites. The two (2C6.2B9, 2C6.2E4) clones producing mAb against uNK cell cytoplasm contents showed one positive band (41,4 KDa) in the western blot matched to the DBA lectin positive bands. The other two clones (2C4.1C10 e 2C4.5A10) producing mAb reacting on cell surface and cytoplasm contents showed two positive bands (52,0 KDa and 53,8 KDa) corresponding to DBA lectin positive bands.

Therefore, the antibody production against uNK cells after intra-specie inoculation is the first direct evidence showing uNK cells as being a cell lineage specific of pregnancy, which express specific molecules recognized as non-self by male of the same strains. Among the mAb obtained, those reactive to antigen localized on cell surface

could be used as specific cell marker of uNK once recognize the same glycoconjugates reactive to DBA lectin that seems to be expressed only by this cell.

1. INTRODUÇÃO

1.1 –Características gerais das células NK uterinas

Na região mesometrial de cada sítio de desenvolvimento embrionário ou fetal de roedores ocorre um acúmulo transitório de células linfocitárias da linhagem *natural killer* (NK).

Essas células foram inicialmente denominadas células granulosas da glândula metrial (GMG) (Selye e Mckeown, 1935; Peel, 1989), devido à sua localização anatômica e por apresentarem grânulos citoplasmáticos em seu citoplasma (Peel, 1989). Pelos estudos de imuno-fenotipagem foram identificadas como pertencentes à linhagem de linfócitos NK e são atualmente denominadas NK uterinas (NK-u) (Croy, 1990), sendo porém encontradas na literatura outras denominações tais como “NK decíduais”, “NK like” e “NK endometriais. Células análogas as NK-u são encontradas no útero de outras espécies animais além de camundongos e ratos, como porcos (Croy et al., 1994), e macacos (Cardell et al., 1969).

Em camundongos, as NK do ambiente uterino (NK-u) originam-se de linfócitos precursores oriundos da medula óssea (Peel et al 1983), migram, proliferam e diferenciam-se na região mesometrial, predominantemente na área da glândula metrial e na decídua basal (Peel et al., 1983; Peel e Stewart, 1984; Stewart, 1991). São raramente encontradas em úteros de camundongos virgens, ou antes da implantação, mas aumentam rapidamente em número após a implantação embrionária (Peel, 1989; Stewart and Peel, 1981).

Por volta do 6º dia de gestação (ddg) as NK-u na sua forma imatura são encontradas na região mesometrial. São células menores, sem grânulos ou acúmulo de glicogênio no citoplasma (Paffaro Jr et al., 1999). A maturação destas células caracteriza-se morfológicamente pelo aumento de tamanho e desenvolvimento de proeminentes grânulos citoplasmáticos (Peel, 1989; Corrêa da Silva, 1997; Delgado et al 1996).

Estudos morfológicos das células NK-u, plenamente diferenciadas, mostram células de formato oval ou esférico com 20 a 50 µm de diâmetro, sendo ocasionalmente binucleadas (Parr e Young, 1990, Corrêa da Silva, 1997). Neste estágio elas possuem citoplasma abundante, contendo glicogênio e grânulos citoplasmáticos caracterizados pelo conteúdo PAS positivo diastase resistente (Wislocki et al., 1957, Bulmer, 1968, Corrêa da Silva, 1997). O conteúdo dos grânulos parece ser idêntico ao das demais NK,

sendo identificadas a perforina, granzimas e uma gama variada de enzimas hidrolíticas lisossomais (Parr et al., 1990b).

Ao microscópio eletrônico, as células NK-u apresentam complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, além de grânulos com compartimento duplo. Morfologicamente estes grânulos se caracterizam por um core central homogêneo e um "cap" periférico elétron-denso. Estes compartimentos também são diferentes funcionalmente, sendo o core central o compartimento secretor e o "cap" periférico o lisossomal. Por estas características, estes grânulos são denominados lisossomas secretores (Peel, 1989; Croy e Kiso, 1993).

Os mecanismos regulatórios que contribuem para a migração, proliferação, diferenciação e mesmo regressão das NK-u ainda não são plenamente conhecidos. A decidualização, mas não a presença do feto seria essencial para estimular a proliferação, acumulação e maturação de grânulos nas células NK-u, uma vez que estas células estão presentes no útero de animais em pseudo-gestação (Peel, 1989).

Por volta do 15º ddg as NK-u iniciam um processo de regressão, diminuindo gradualmente até o final da gestação e desaparecendo no útero pós-parto (Croy et al., 1997; Corrêa da Silva, 1997). No período próximo ao parto essas células sofrem morte celular programada e desaparecem do ambiente uterino, sendo as remanescentes eliminadas no momento do parto juntamente com a placenta e por isso não são encontradas no útero pós-parto (Delgado et al, 1996; Jacobulcci, comunicação pessoal).

Estudos realizados em camundongos imunodeficientes em células T e B (SCID/SCID) demonstraram que não há alteração na diferenciação, aparência, frequência e localização das NK-u, quando comparada a camundongos imunocompetentes, o que comprova que essas células não pertencem às linhagens de linfócitos T ou B (Guimond, 1996). Por outro lado, além da semelhança fenotípica com as células NK circulantes (NKc), a comprovação de que as células NKu pertencem à linhagem NK tem sido demonstrada nos elegantes experimentos de Guimond et al (1997, 1999) com transplante de linfócitos em animais transgênicos imunodeficientes em células NK e T ($T\epsilon 26$) e imunodeficientes em células NK, T e B ($Rag^{-/}\gamma c^{-/}$).

Em camundongos, as Nk-u migram da parede uterina via vascularização materna para a placenta fetal, onde se pressupõe que desempenhem uma interação citotóxica com o citotrofoblasto (Stewart, 1984). Sugere-se que a função lítica das NK-u seja um

importante fator limitante do potencial invasivo dos trofoblastos. (Peel 1989; Stewart,1990). Sugere-se também que a presença das NKu no período peri-implantacional no endométrio esteja relacionada com a lise do epitélio uterino para permitir adesão/invasão das células trofoblásticas (Welsh e Enders, 1993). Além disso, propõe-se a sua participação na reabsorção de embriões inviáveis (Croy e Kiso, 1993) e, possivelmente, na indução de abortos (Clark, 1991).

Estudos recentes salientam a hipótese de que estas células também estejam relacionadas com o desenvolvimento da placenta. O tamanho da placenta e a ausência de células NK-u estão entre as deficiências encontradas em camundongos imunodeficientes em células NK e linfócitos T (Guimond et al., 1999). Ensaio realizado com animais transgênicos Tg ϵ 26, mostram que as células NK e não os linfócitos T ou B são capazes de influenciar o desenvolvimento normal da placenta durante a gestação, particularmente pela produção do interferon gama (IFN γ) (Ashkar and Croy, 1999). Anomalias semelhantes durante a gestação foram constatadas em camundongos deficientes na produção de IFN γ (Ashkar and Croy, 1999). Presume-se, portanto, que a presença de células NK competentes é requerida em cada compartimento materno e fetal, para otimizar o crescimento da placenta (Guimond,et. al., 1999).

1.2 – Natural Killer X Natural Killer uterinas. Semelhanças e diferenças

Células NK constituem uma população de linfócitos que se distingue das demais devido à ausência de receptores encontrados em células T e B (Trinchieri, 1989). Podem lisar espontaneamente certas células tumorais e células infectadas por vírus, sem uma sensibilização prévia. O mecanismo molecular que permite que as células NK "lisem" outras células baseia-se em receptores inibidores KIR (killer inhibitory receptor) e ativadores KAR (killer activator receptor), presentes em sua superfície. As NK possuem receptores que reconhecem moléculas da classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) expressas em células normais. A perda de expressão de um ou mais alelos do MHC da classe I ou a expressão de quantidade insuficiente de moléculas classe I permite que as NK lisem a célula alvo (Trinchieri, 1989; Ljunggren and Karre, 1990). A capacidade lítica das células NK é atribuída à liberação do conteúdo dos grânulos por mecanismo de exocitose, após o reconhecimento das células alvo pelas NK mediado por receptores de membrana (Trinchieri, 1989). Desta forma, as células NK

atuam na imunidade inata e adaptativa, desempenhando não só uma função lítica mas também produzindo inúmeras citocinas (Trinchieri, 1989, Kurago et al, 1998).

As NK-u expressam, em sua superfície, alguns marcadores comuns às células Natural Killer, tais como: asialo-GM1, Ly-49G2 (LGL-1), NK1.1, Thy-1, FcR, 4H12, e CD45 (Parr et al., 1990b; Bernard et al., 1978; Mukhtar et al., 1989; Redline e Lu, 1989; Linnemeyer e Hamilton, 1990; Croy e Kiso, 1993).

Asialo-GM1 é um glicoconjugado (esfingosídeo), expresso em altos níveis pelas NK de camundongos (Kassai et al., 1980). Segundo revisão feita por Lai et al.(1998) sobre antígenos de superfície de células de camundongos, o marcador Thy-1 é uma proteína transmembrana "GPI-linked", que tem como possível função a ativação de linfócitos T. A molécula NK1.1 (NKR-P1C em camundongos) é uma proteína integral do tipo II. Sua expressão está relacionada com a habilidade de lisar células tumorais "in vitro" e mediar a reação de rejeição de aloenxertos de medula óssea (Yokoyama et al., 1989, Yokoyama et al., 1993). A molécula LGL-1 é um homodímero ligado por pontes de dissulfeto, expresso por um subgrupo de células NK de camundongos que é altamente homóloga aa moléculas da família Ly-49. Células NK, ativadas por IL-2 difere seu comportamento de acordo com a expressão de LGL-1 (Mason et al., 1988).

As células NK-u de humanos são fenotipicamente e funcionalmente diferentes das NK do sangue circulante (NKc). Elas são CD56⁺/ CD16⁻, enquanto as NKc de sangue periférico são CD56⁺/CD16⁺ (Nagler et al., 1989; Jones et al., 1997). CD56 é uma isoforma da molécula de adesão neural N-CAM e sua função nas células NK é desconhecida (Lanier et al., 1991). CD16 é o receptor de baixa afinidade pela porção Fc de IgG (imunoglobulina) e é usado pelas NK para reconhecer células cobertas por anticorpos na citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) (Mandelboim et al., 1999).

As NK expressam receptores CD94/NKGA que são proteínas heterodiméricas, transmembrana do tipo II, que se ligam a moléculas não-clássicas do HLA-E. Este receptor, considerado inicialmente apenas como um receptor inibitório, também tem a capacidade de ativar as NK, dependendo dos diferentes membros da família dos NKG2, que se ligam à molécula de CD94 (Perez et al., 1996; Carretero et al., 1997; Houchins et al., 1997). As células NKu de humanos, assim como as demais NK, expressam receptores KIR (*Killer inhibitory receptor*) que são proteínas transmembrana do tipo I

(Lanier, 1998), as quais reconhecem as moléculas dos HLA-G e HLA-E do MHC expressas pelos trofoblastos. Dessa forma a interação entre as células NK-u e os trofoblastos pode ser um importante mecanismo envolvido na tolerância materno fetal, pelo qual a mãe controla a implantação da placenta alogênica (King et al., 2000). A molécula Ly-49 é o correspondente do KIR em camundongos.

As NK-u diferem das demais células NKc ainda quanto à composição das citocinas secretadas e quanto à resposta frente a estímulo por citocinas. Enquanto as células NK secretam, GM-CSF (fator estimulador de colônia Granulócito-Macrófago), IL(interleucina)-3, IL-5 (Cuturi et al., 1989; Warren et al., 1995), as NK-u secretam citocinas, tais como IL-1, CSF-1 e LIF (fator inibidor de leucemia) (Pollard, 1991, Croy et al 1991b, Guilbert et al, 1993). Estudos feitos por Croy e colaboradores (1991b) não detectaram a expressão de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, G-CSF, TNF(fator de necrose tumoral) α , TNF β em NKu de camundongos, porém em relatos mais recentes, Parr e colaboradores (1995), demonstraram a produção de TNF α pelas NK do ambiente uterino.

As NK-c ainda são influenciadas por uma variedade de citocinas como IL-1, IL-2, IL-10 e IL-12. Possuem citotoxicidade espontânea e "in vitro" têm a capacidade de lisar, espontaneamente, células de mieloma YAC-1 e P815 (Triencheri, 1989; Stewart, 1991; Warren, 1996). Além disso, esta capacidade citolítica é aumentada na presença de IL-2. As NK-u, por sua vez, não possuem essa capacidade citolítica espontânea, mesmo na presença de IL-2 (Croy e Kassouf, 1989; Parr et al., 1990a; Linnemeyer e Pollack, 1991; Stewart e Peel, 1993; Croy e Kiso, 1993).

Ye e colaboradores (1996) também sugerem que a IL-2 não está envolvida na diferenciação das NK-u como ocorre com as células NK. Dados recentes sugerem que IL-15 no útero tenha um importante papel na promoção da sobrevivência e expansão das células NK-u, sem, no entanto, induzir sua atividade citotóxica (Verma et al, 2000).

São ainda expressos pelas NK-u, genes para a produção de matriz extracelular (Nomura et al., 1988; Braga e Gendler, 1993), proteínas citolíticas e enzimas hidrolíticas (Croy et al., 1991c; Parr et al., 1991; Straatsburg e Gossrau, 1994) além de citocinas e receptores para citocinas (Croy et al., 1991b; Hunt, 1994). As secreções de proteínas da matriz extracelular e citocinas podem estar relacionadas com a migração destas células no útero (Wegmaman e Guilbert, 1992; Croy et al., 1993; Yelian et al. 1993). Numerosas

projeções citoplasmáticas, de várias formas e tamanhos, são também indícios da habilidade migratória das NK-u (Mukhtar e Stewart, 1993). Wang e colaboradores (2000) demonstraram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas NK-u, sugerindo que estas células tenham função na angiogênese do útero e da placenta.

Como as NK-u possuem em seus grânulos, perforina e serina esterases, proteínas comuns aos linfócitos citolíticos (NK e LAK - lymphokine active killer cell), que lisam células tumorais e infectadas por vírus (Zheng et al., 1991b), espera-se igual competência funcional das NK-u. Estas células, porém, não medeiam, espontaneamente, a lise de células alvo "in vitro", comumente utilizadas para ensaios citolíticos de NK, em geral (Croy e Kassouf, 1989; Parr et al., 1990a). A baixa citotoxicidade natural apresentada pelas NK-u humanas pode ser devido a ausência de expressão do receptor CD16, este, um potente indutor da atividade lítica das NK (Biassoni et al., 1999).

Estudos "in vitro" realizados por Webster e Stewart (1997) sugerem a exocitose do conteúdo granular das NK-u durante a citólise de células Wehi 164. Stewart and Peel (1999) demonstraram, em ensaios citolíticos entre as células NK-u e as células alvo Wehi 164, que o mecanismo de citotoxicidade ocorre pelo íntimo contato célula/célula, com a liberação, pela célula efetora, de uma alta concentração de Fator de Necrose Tumoral ($TNF\alpha$) sobre a superfície das células alvo. O uso de anticorpos anti- $TNF\alpha$ diminui o efeito citotóxico das NK-u sobre as células alvo.

Constata-se, portanto, que se de por um lado, as NK-u são fenotipicamente semelhantes às células NK em geral, por outro lado, evidencia-se que as NK-u apresentam um comportamento próprio, distinto das demais NK. Tais características podem ser decorrentes da expressão gênica peculiar nestas células que determinam o mecanismo de ativação/supressão altamente controlado e específico no ambiente uterino. Presume-se, assim, que as NK-u possam expressar um ou mais receptores de membrana que isoladamente ou em conjunto determinem este comportamento específico, os quais não seriam expressos pelas NK-c. Porém, até o momento, não tem sido identificada qualquer molécula específica, ou ainda, qualquer marcador específico (anticorpos) para as NKu.

As tentativas de obtenção de anticorpos monoclonais produzidos em rato contra células NK-u de camundongo demonstraram que tais anticorpos não eram específicos à linhagem NK-u, apresentando reação cruzada com outras linhagens linfocitárias (células T e NK) (Stewart et al., 1994). Trabalhos anteriores (Corrêa da Silva e colaboradores, 1996; Corrêa da Silva, 1997) e outros em andamento deste laboratório vêm utilizando, com sucesso, a lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutin*) nos métodos citoquímicos para marcação seletiva das NK-u de camundongos. Pela citoquímica ultra estrutural, são observadas reações positivas, tanto no conteúdo granular quanto na superfície celular (Corrêa da Silva, 1997). Esta reatividade na superfície celular também é observada nas formas imaturas de NK-u, isto é, sem conteúdo granular (Paffaro Jr, comunicação pessoal). Esta lectina não apresenta reação positiva para outras populações linfocitárias presentes nos órgãos linfóides primários e secundários, exceto nos grânulos de células NK esplênicas (Haraguchi, et al., 1999).

Presume-se assim que os glicoconjugados DBA reativos, presentes na superfície das células NK-u, cuja natureza ainda é desconhecida, sejam moléculas de expressão específica destas células.

1.3 - Hipóteses

Várias evidências indiretas indicam a existência de uma população de células NK encontradas exclusivamente no útero (NKu), durante a gestação, que diferem daquelas encontradas no sangue circulante (NKc). Dentre essas evidências, a reatividade altamente seletiva da lectina DBA (*Dolichos biflorus*) com glicoconjugados presentes na superfície celular parece ser a mais promissora para se identificar uma molécula de expressão específica das células NKu em camundongos. Como os glicoconjugados presentes no citoplasma são igualmente reativos nas NK esplênicas (Haraguchi, et al., 1999), o interesse maior restringe-se àqueles glicoconjugados expressos na superfície celular.

Tal glicoconjugado da superfície celular seria um potencial marcador específico das células NKu de camundongos e a obtenção de anticorpos específicos para tal molécula, assim como a elucidação da sua função nestas células, seria do maior interesse para o prosseguimento dos estudos relacionados com a imunologia da reprodução. Porém, não se tendo a caracterização bioquímica do conjunto de

glicoconjugados reativos à lectina DBA, torna-se impossível identificar qual glicoconjugado deveria ser isolado e purificado, para inicialmente ser utilizado como inóculo antigênico na obtenção de anticorpos.

O conceito imunológico básico preconiza que cada indivíduo imunocompetente é capaz de discernir entre o próprio e o não próprio (Abbas et al., 1998). Tentativas anteriores (Stewart et al., 1994) utilizando células NKu íntegras de camundongos como inóculos para imunização em rato foram bem sucedidas, porém foram obtidos anticorpos monoclonais de espectro amplo que reconheciam não apenas células NKu, mas também linfócitos T. Tal resposta é compreensível, considerando-se que a imunização interespecie com células totais, contém inúmeras moléculas antigênicas, estas capazes de serem reconhecidas prontamente como não próprias pelo animal imunizado.

Frente a esses dados e partindo do pressuposto de que as células NK-u expressam moléculas específicas não comuns as demais NK, foi proposto a imunização com células NK-u totais de camundongos, em machos da mesma espécie. Presume-se ainda que mesmo com a inoculação intra-espécie, em ocorrendo a resposta imune do receptor, esta seria com a ativação de clones linfocitários produtores de anticorpos específicos para as moléculas de expressão exclusiva das NK-u, mas não para as NK em geral.

Para tanto, no presente trabalho, foram idealizados e desenvolvidos protocolos para a obtenção de células NKu isoladas de camundongos, inoculadas em machos da mesma espécie para obtenção de anticorpos específicos para estas células.

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Obtenção de anticorpos para reconhecimento de antígenos de expressão específica das células NK-u de camundongos.

2.2 - Específicos

- Avaliar a universalidade da expressão de glicoconjugados de superfície, reativos à lectina DBA, em células NK-u de diferentes linhagens de camundongos.
- Estabelecer uma estratégia de imunização, direcionada à obtenção de anticorpos específicos contra antígenos presentes nas células NK-u de camundongos.
- Caracterizar os clones linfocitários quanto à especificidade dos anticorpos produzidos, por meio de métodos imunoquímicos e imunocitoquímicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens Swiss, BALB/c, CBA-J, DBA-2, SJL e C57BL/6, com idade aproximadamente de 12 a 16 semanas, provenientes do CEMIB/UNICAMP.

Para a obtenção de animais com período de gestação conhecida, fêmeas virgens foram acasaladas com machos de suas respectivas linhagens e a manhã do dia em que era encontrado o tampão vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação (ddg).

Camundongos machos *specific pathogen free* (SPF) da linhagem BALB/c, de 8 a 10 semanas de idade destinados à imunização, procedentes do CEMIB/UNICAMP, foram mantidos no Biotério SPF do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB/UNICAMP, durante o período que compreendeu os procedimentos de imunização.

3.2 – Coleta e processamento histotécnico

Fragmentos de tecidos de fêmeas prenhes no 9ºddg, das linhagens Swiss, Balb/c, CBA-J, DBA-2, SJL e C57BL/6, assim como de fêmeas virgens foram processados para embebição em parafina, conforme os procedimentos a seguir.

3.2.1 – Fixação por perfusão e embebição em parafina

Foi utilizada a solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% (Sigma Chemical Co, St Lous/USA) em tampão fosfato de sódio salina (PBS) 0,1M, pH 7,4. A solução fixadora foi perfundida via ventrículo esquerdo, por um período de 15 minutos em um volume aproximado de 30ml para cada animal. Após a perfusão foram retirados os cornos uterinos e os sítios de implantação seccionados sagitalmente na região mediana e orientados transversalmente na embebição.

Os sítios permaneceram imersos por um período adicional de 2 horas na mesma solução fixadora, sendo em seguida processados de acordo com a técnica rotineira de embebição em parafina (Paraplast Plus - Sigma Chemical Co USA).

O mesmo procedimento de fixação e embebição em parafina foi utilizado para o processamento de timo, baço e linfonodo obtidos de fêmeas virgens.

3.2.2 – Citoquímica de lectina DBA

Cortes em parafina de sítios uterinos (5µm de espessura), timo e baço coletados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina foram desparafinizados e hidratados para a reação citoquímica de lectina.

Após lavagem com PBS 0,05M, os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio (Merck/Brasil) (30 volumes) 1% em PBS - 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguidos do bloqueio com PBS/BSA (Albumina Sérica Bovina) 1% (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) pH 6,8, durante 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com lectina DBA biotinada (*Dolichos biflorus agglutin*) (Honen Chemical Co; Japão) em PBS/BSA 1%, pH 6,8, por 12 horas a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação com o complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako Corporation-EUA) - 1 hora à temperatura ambiente, foi feita a revelação com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) em tampão tris salina (TBS) 0,05M, pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck/Brasil). Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, e foram procedidas a desidratação e montagem permanente, em bálsamo sintético (Entellan, Merck).

As reações foram sempre acompanhadas de controles negativos, onde a lectina DBA era previamente inibida com 0,1M de N-acetil-galactosamina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), ou ainda com a omissão da incubação com a lectina.

3.3 - Isolamento das células NK-u, pelo método biomagnético

Foram utilizadas fêmeas das linhagens Swiss e Balb/c, no 9ºddg. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os cornos uterinos removidos em condições assépticas em fluxo laminar.

Os sítios de implantação coletados foram colocados em meio Hanks (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) contendo BSA 2% e a região do triângulo mesometrial, de cada sítio, dissecada. Estas foram maceradas e homogeneizadas em meio Hanks, contendo DNase-1000UN (Desoxyribonuclease I - Sigma Chemical Co), por meio do uso de pipeta *Pasteur* previamente heparinizada. O macerado foi filtrado em tela de nylon com malha de 80µm (Nitex -Schoweisten) e após 5 minutos, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 RPM durante 10 minutos, a 4°C. Após 2 lavagens, por centrifugação (1500 RPM durante 10 minutos), com meio Hanks/BSA 2%, o sedimento celular foi

ressuspensão em 1ml de meio Hanks/BSA 2% para a contagem das células totais em câmara de Neubauer.

Em seguida, as células foram associadas com esferas biomagnéticas (M450 Cellaction-Biotin Binder Kit-Dynal), previamente conjugadas com lectina DBA (Sigma), na proporção estimada de 5 esferas/célula, a 4°C, durante 30 minutos, sob agitação constante. Com o auxílio do magneto concentrador de partículas (MPC - Dynal), as células associadas às esferas biomagnéticas, foram imobilizadas e lavadas 2x com PBS, para a remoção das células não associadas.

À suspensão celular conjugada com biomagnetos/lectina foi adicionado 0,1M de N-acetil-galactosamina e mantida sob agitação constante durante 20 minutos a 4°C. Em seguida, as esferas biomagnéticas foram removidas no MPC e as células desassociadas foram removidas e lavadas com solução fisiológica por meio de centrifugação (1500 RPM-10 min).

A viabilidade tanto das células associadas quanto das desassociadas das esferas, foi avaliada pelo uso de Azul de Tripán 1% e quantificadas na câmara de Neubauer.

O controle da presença de células NK-u foi realizado com células associadas às esferas biomagnéticas e concentradas pelo MPC. Estas foram fixadas com acetona e em seguida submetidas à reação com a lectina DBA biotinada (1:300) por 30 minutos. Após lavagem com PBS 0,05M, as células foram tratadas com o complexo estreptoavidina-fluoresceína (Amershan, UK) por 30 minutos. Após exaustiva lavagem no MPC com PBS 0,05M, a suspensão celular foi montada entre lâmina e lamínula, para observação em microscópio acoplado ao sistema de epi-fluorescência (Nikon Eclipse E800) (filtro barreira 515-555 nm,/excitação 465-495 nm).

Por este procedimento pode-se obter, em média, 6 a 8 x 10³ células DBA positivas/ sítio de implantação embrionária.

3.4 – Imunização dos animais e obtenção de anticorpos monoclonais

3.4.1 – Protocolo de imunização de camundongos

Foram utilizados seis camundongos machos da linhagem Balb/c, procedentes do CEMIB/UNICAMP mantidos em biotério estéril, do Departamento de Microbiologia e Imunologia – IB/UNICAMP, como receptores do inóculo antigênico.

Como inóculo antigênico, foram usadas células NK-u totais, obtidas conforme descrito em 3.3 e inoculadas via intraesplênica e intraperitoneal.

*As células destinadas à inoculação via intraperitoneal foram rapidamente fixadas em solução de paraformaldeído 4% e exaustivamente lavadas.

3.4.1.1 - *Inoculação intraesplênica*

Com o animal anestesiado (Virbaxil 2% e Francotar), a região lateral esquerda do abdômen foi tricotomizada e após assepsia do local com álcool iodado, realizou-se uma incisão de 1,5cm na pele para localização do baço, através da musculatura, que foi mantida intacta. Inoculou-se uma suspensão de células NK-u no interior do baço.

Verificando-se a não ocorrência de hemorragia no baço, a pele do animal foi suturada e constatada a recuperação da anestesia, os animais foram então mantidos com alimentação e água "ad libitum", no Biotério SPF do laboratório de Microbiologia e Imunologia – IB/UNICAMP.

3.4.1.2 - *Inoculação intraperitoneal*

Após 7 dias da inoculação intraesplênica, os animais receberam de 2 a 3 doses consecutivas, de inóculo antigênico, via intraperitoneal, com intervalos de 7 dias entre cada dose.

3.4.1.3 - *Etapas de imunização*

Os camundongos receptores receberam um inóculo inicial, via intraesplênica, de 5×10^4 células em 100 μ l de solução fisiológica. Em intervalos de 7 dias, após inoculação intraesplênica, estes animais receberam 2 a 3 doses consecutivas de inóculos na mesma concentração, por via intraperitoneal. Antes de cada inoculação foram coletadas amostras de sangue via plexo orbital. Os soros destas amostras sanguíneas foram testados por meio de testes imunocitoquímicos, como descrito no item 3.5.1. Do animal

que respondeu à imunização com produção de anticorpos capazes de reconhecer estruturas de superfície celular de células NK-u por imunocitoquímica, recebeu uma dose de reforço contendo 1×10^5 , via intraperitoneal, sendo sacrificado 3 dias após, para a coleta do seu baço, conforme descrito em 3.4.2.3.

3.4.2 - Obtenção dos hibridomas

3.4.2.1 - *Preparo da camada de macrófagos peritoneais de camundongos*

(feeder-layer)

Células normais da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram assepticamente obtidas para o preparo do *feeder-layer* de macrófagos. Para a coleta das células peritoneais, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e mergulhados em uma solução de álcool a 70% (v:v). Em fluxo laminar, injetou-se na cavidade abdominal 3mL de meio HAT:meio RPMI-1640 (Sigma) completo com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma), próprio para hibridoma, 2g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 2g/L de HEPES (*N*-[2-Hydroxyethyl] piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) (Sigma), 2 μ L/L de 2-mercaptoetanol, (Merck; München, Germany), 0,136mg/L de hipoxantina (Sigma), 0,03mg/L de aminopterin (Sigma) e 0,038mg/L de timidina (Sigma). Após massagem suave do abdômen dos animais, o líquido carreando as células peritoneais foi aspirado. A suspensão celular obtida foi transferida para tubos estéreis (Corning Corporation; Cambridge, MA, USA) que foram mantidos em banho de gelo. Uma pequena alíquota da suspensão foi diluída 20 vezes em solução de Turck (2% de ácido acético em água e gotas de azul de metileno a 1%), para contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, a concentração celular foi ajustada em 3×10^6 células/mL.

As células foram distribuídas em placas estéreis, de 24 poços, fundo chato (Corning), na densidade de 4×10^4 células/500 μ L/poço. Em seguida, as placas foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, durante 48 horas a 37°C.

Para os procedimentos de clonagem dos hibridomas, placas de 96 poços foram preparadas de maneira semelhante, contendo *feeder-layer* de macrófagos, exceto pela concentração celular de 2×10^3 células/100 μ L/poço.

3.4.2.2 - *Preparo das células de mieloma*

As células de mieloma SP2 (SHULMAN *et al.*, 1978) foram adequadamente descongeladas e, posteriormente, cultivadas em meio RPMI-1640 completo, acrescido de 0,125mg/L de 8-azaguanina (Sigma). As culturas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37°C. Ao atingir a semi-confluência, as células foram repicadas e subcultivadas na presença de meio completo. Aproximadamente 18 horas após o repique, as células foram coletadas dos frascos de cultivo e transferidas para tubos estéreis para serem sedimentadas por centrifugação a 1500 RPM durante 15 minutos, a 20°C. O sedimento obtido foi ressuspensionado em meio RPMI-1640 completo e uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração e viabilidade celular.

3.4.2.3 – *Obtenção e preparo das células esplênicas*

O animal imunizado que apresentou soro reativo com células NK-u em testes imunocitoquímicos foi sacrificado por deslocamento cervical e mergulhado, em seguida, em uma solução de álcool a 70% (v:v). Em fluxo laminar, a cavidade abdominal do animal foi exposta assepticamente para a remoção do baço, o qual foi transferido para meio RPMI (Sigma Chemical Co, St Louis/USA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SBF). O baço foi macerado e a suspensão celular obtida, centrifugada a 1500 RPM por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensionado 1:1 em Soro Fetal Bovino. Foram, então, acrescentados lentamente 10% de DMSO à suspensão celular e imediatamente congelada em biofreezer. Após 24 horas, os recipientes contendo as células esplênicas congeladas foram armazenados no nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento da fusão. Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi retirada para a determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de Tripan (1%) e quantificação em câmara de Neubauer.

3.4.2.4 - *Fusão celular*

No experimento de fusão celular foi empregado o protocolo descrito por FASEKAS de ST GROTH & SCHEIDEGGER (1980).

Nesta etapa, 10mL da suspensão de células esplênicas, contendo 2×10^7 células, obtidas conforme descrito em 3.4.2.3, foram adequadamente descongelados e 17,5mL da suspensão de células de mieloma SP2 (SHULMAN *et al.*, 1978), contendo 3×10^7

células, obtidas conforme descrito em 3.4.2.2, ambas com viabilidade acima de 90%, foram reunidos em um tubo cônico estéril (Corning). Em seguida, o volume foi completado para 50mL com meio RPMI-1640 sem soro e centrifugado a 1500 RPM, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento celular obtido foi ressuspensionado em 1,0mL de uma solução de polietileno glicol (PEG-1500, Merck; München Germany) a 50% em salina 0,15M, adicionado de 10% de DMSO (Merck; München, Germany), o qual foi adicionado gota a gota, sob agitação constante durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, esta suspensão foi mantida a 37°C durante 90 segundos sob agitação constante. Em fluxo laminar, foram adicionados lentamente 20mL de salina de FASEKAS (PBS, pH 7,2, contendo 0,4g/L de cloreto de potássio, 2g/L de glicose e 0,01g/L de vermelho de fenol) (1 ml/30 segundos; 3 ml/30 segundos; restante em 60 segundos). O volume da suspensão foi completado para 50mL com a salina de FASEKAS e a mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 1500 RPM, por 15 minutos e o sedimento celular obtido foi ressuspensionado em 50mL de meio RPMI-1640 completo, para uma segunda etapa de centrifugação semelhante à anterior.

Finalmente, as células foram ressuspensionadas em meio HAT e distribuídas, na concentração de 10^6 células/poço, em 3 placas de 24 poços previamente preparadas, contendo *feeder-layer* de macrófagos. As placas foram mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, acompanhadas periodicamente, porém tomando-se o cuidado de não provocar distúrbios no meio.

3.4.2.5 - Seleção dos hibridomas

Aproximadamente 10 dias após o experimento de fusão celular, o sobrenadante de cada poço com crescimento de clones foi testado para a detecção das culturas contendo os híbridos secretores de imunoglobulinas anti-NK-u, por meio de testes imunocitoquímicos, como descrito no item 3.5.1.

3.4.2.6 - Clonagem das culturas de hibridomas

As culturas das placas de fusão (24 poços) secretoras de imunoglobulinas de interesse foram clonadas por técnica de diluição limitante. Para isso, a concentração celular das culturas, cujos sobrenadantes apresentaram os melhores resultados nos

testes imunocitoquímicos, foi determinada por meio de contagem em câmara de Neubauer, permitindo o preparo de suspensões celulares em meio HT (meio RPMI completo, contendo 0,136mg/L de hipoxantina e 0,038mg/L de timidina), contendo 100 células/mL de cada cultura. Cada uma das suspensões foi semeada em uma placa de 96 poços (50µL/poço), contendo *feeder-layer* de macrófagos, previamente preparados como descrito no item 3.4.2.1. Desta forma, foram preparadas placas de clonagem com células na densidade de 5 células/poço, respectivamente. As placas foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂, com 95% de umidade relativa, a 37°C por aproximadamente 12 dias. Os poços que apresentaram crescimento de um único clone tiveram seus respectivos sobrenadantes testados por imunocitoquímica, como descrito no item 3.5.1.

3.4.2.7 - *Expansão e criopreservação dos hibridomas*

As culturas contendo hibridomas secretores de anticorpos de interesse foram expandidas por meio de subcultivos em frascos de cultura (T-25, Corning) na presença de meio RPMI-1640 completo e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, a 37°C. Após o crescimento em semi-confluência, as culturas que permaneceram secretoras dos anticorpos de interesse foram coletadas dos frascos e transferidas para tubos plásticos estéreis. Uma alíquota das suspensões foi utilizada para contagem em câmara de Neubauer. Após a centrifugação a 1500 RPM por 15 minutos, o sedimento celular obtido foi ressuscitado em meio de congelamento (RPMI-1640 completo contendo 10% de DMSO) em volumes suficientes, obtendo-se suspensões de 1,0 – 2,0 x 10⁶ células/mL. As suspensões obtidas foram transferidas para os tubos apropriados para o congelamento de células (1mL/frasco), os quais foram transferidos, imediatamente, para um freezer a -70°C. Cerca de 24 horas após o congelamento a -70°C, os tubos foram transferidos para reservatórios de criopreservação, contendo nitrogênio líquido. De cada clone, foram estocadas entre 5 e 10 ampolas.

3.4.2.8 - *Determinação dos isotipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais*

Para a determinação dos isotipos de imunoglobulinas produzidas pelos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (culturas submetidas à clonagem), os sobrenadantes de cultura coletados dos frascos de cultivo foram testados contra anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA e anti-IgM) por meio de um Kit comercial de isotipagem (Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS; PIERCE, USA).

3.4.2.9 - *Produção de ascite*

Camundongos BALB/c foram injetados intraperitonealmente com 1mL de óleo mineral (Nujol, Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ). Após aproximadamente 7 dias da injeção do Nujol, os animais receberam, pela mesma via, uma injeção de 0,5mL de suspensão contendo $0,75 \times 10^6$ células de um hibridoma secretor do anticorpo monoclonal anti-NK-u. Decorridos aproximadamente 7 dias da injeção dos hibridomas, os líquidos ascíticos formados foram coletados por punção peritoneal. Para cada clone foram empregados 4 animais, dos quais foram coletados, no total, cerca de 10mL de ascite. Foram produzidas ascites de 4 clones de hibridoma.

Os *debris* celulares e o óleo mineral foram separados das ascites por centrifugação a 1500 RPM, durante 15 minutos, a 20°C. As ascites límpidas e livres de células foram estocadas a -20°C, até o momento do uso. Antes do congelamento, alíquotas de cada ascite foram destinadas à determinação do título de anticorpos, por meio de ensaios imunocitoquímicos e imunoquímicos, conforme procedimentos descritos em 3.5.

3.5 – Testes imunocitoquímicos e imunoquímicos

3.5.1 – Método imunocitoquímico

3.5.1.1 – *Reação de imunofluorescência indireta em células NK-u isoladas*

Células Nk-u isoladas como descrito no item 3.3.1 foram semeadas em lâminas com 8 ou 10 cavidades e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 24 horas. Após aderência das células nas lâminas, estas foram lavadas com TBS 0,05M e fixadas com

metanol a 20°C, durante 1 hora. As lâminas foram conservadas a 4°C até o momento do uso.

Para os ensaios imunocitoquímicos, as lâminas foram hidratadas com TBS 0,05M durante 10 minutos. Em seguida elas foram incubadas com soro de coelho, contendo IgG de camundongo, na diluição de 1/10, em TBS 0,05M com 0,1% de gelatina. Após lavagem com TBS, as lâminas foram incubadas com os soros de camundongos pré-*imunes* e pós-*imunizados* em várias diluições (1:10 a 1:320). Novamente foram realizadas lavagens com TBS, seguidas de incubação com anti-*imunoglobulina* de camundongo, obtida em coelho, conjugada com fluoresceína, na diluição 1/200. Após exaustiva lavagem com TBS, as lâminas foram montadas com Fluoromont G (EMS, EUA) e observadas em microscópio acoplado ao sistema de epi-fluorescência (Nikon eclipse E800).

3.5.1.2 – *Reação de imunofluorescência indireta em cortes histológicos*

Cortes em parafina de 5µm de espessura de sítios de implantação e órgãos linfóides (timo, baço e linfonodo) processados em 3.2.1 foram coletados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina, desparafinizados e hidratados. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao tratamento com microondas, em solução de tampão citrato 0,1M pH 6,0: 4 ciclos de 800 MHz, durante 3 minutos (Torre et al., 2000). Na seqüência, os cortes foram lavados com PBS 0,05M, bloqueados com PBS/BSA 1%, durante 30 minutos e incubados com: soro do animal imunizado; soro do animal não imunizado em várias diluições; sobrenadantes da cultura dos hibridomas e líquido ascítico dos hibridomas, durante 1 hora à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS 0,05M e bloqueados com PBS/BSA 1% durante 30 minutos. Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo secundário de coelho (anti-IgG de camundongo) marcado com fluoresceína, na diluição 1/100. Após exaustiva lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com Fluoromont G e observadas em microscópio de fluorescência (Nikon eclipse E800).

3.5.2 – Método imunológico

3.5.2.1 – *Obtenção de homogenados*

Fêmeas prenhes no 8º e 9ºddg foram sacrificadas para dissecação das glândulas metriais. Os fragmentos foram recortados, pesados e suspensos, na proporção de 30g/ml em tampão PIPES 5mM contendo 0,3M sacarose. A homogeneização foi feita em um homogeneizador-mecânico (Glas-Col, USA) em tubos de vidro, com pistilo de Teflon em banho de gelo. Após a centrifugação, a cada 500µl de sobrenadante foram adicionados 100µl de Triton X-100, PMSF (1mM em isopropanol), pepstatina (1 µmM em metanol), água destilada q.s.p 1000µl e novamente centrifugados a 20.000 RPM.

O sobrenadante do centrifugado foi aliquoteado, sendo parte das alíquotas congelada a -70°C e a outra parte misturada na proporção de 1:1 em tampão amostra para eletroforese. Foi realizada a dosagem de proteínas totais do homogenado obtido, pelo método de *Bradford* (Bradford, 1976). As amostras destinadas à eletroforese foram levadas ao banho-maria fervente por 3 minutos, aliquoteadas e mantidas a -20°C até o momento do uso.

3.5.2.2 - *SDS-PAGE*

A eletroforese das amostras do homogenado preparado em 3.5.2.1 foi realizada em géis de poliacrilamida a 10%, preparadas segundo Laemmli (1970) em mini-placas verticais (8 x 7,3 cm) e foi utilizado como fonte o sistema Mini Protean III (Bio-Rad). As corridas foram sempre acompanhadas por um padrão de peso molecular – Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad) e a fonte de corrente contínua ajustada para 250V, com a amperagem constante em 25mA, por aproximadamente 2 horas.

Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R 250 (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) a 0,25% para conferir o padrão de separação eletroforética ou transferidos para membrana de nitrocelulose.

3.5.2.3 - *"WESTERN-BLOTTING"*

A transferência para a membrana de nitrocelulose (Immobilon-NC-Transfer Membranes e Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore Corporation, U.S.A) foi feita com o sistema de transferência (Bio-Rad), com a corrente ajustada para 2mA/cm²

durante 2 horas. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) 0,5%, para verificar se ocorreu a transferência e após descorar foi submetida à reação imunocitoquímica com o líquido ascítico dos hibridomas e/ou a lectina DBA biotinada.

As membranas de nitrocelulose foram lavadas em tampão de lavagem TBS-T (TBS/Tween 0,1%), bloqueadas com TBS-T contendo 1% de BSA, durante o período de 12 horas (*overnight*) a 4°C, seguidas da incubação com líquidos ascíticos dos hibridomas ou com a lectina DBA.

O líquido ascítico foi incubado na diluição de 1:2000 durante 3 horas à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em tampão de lavagem e incubadas com soro normal de cabra (Vector, USA) diluído em TBS-T 1:200, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem foi feita incubação com anticorpo secundário de cabra, anti-Ig de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 (Santa Cruz, USA) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina – DAB (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) a 0,5% diluída em Tris HCl 0,05M pH7,4 e 4µl de H₂O₂ (30%). O controle do anticorpo secundário foi feito omitindo-se a incubação com o líquido ascítico.

Para a reação com a lectina DBA biotinada (Sigma, USA), as membranas foram incubadas com a lectina na diluição 1:600 durante 3 horas à temperatura ambiente e após lavadas em tampão de lavagem foram incubadas com o complexo estreptoavidina-peroxidase na diluição de 1:1000 (Armasham, U.K.). A reação foi revelada com diaminobenzidina a 0,5% diluída em Tris HCl e 4µl de H₂O₂ (30%). Dois controles foram realizados. Um controle omitindo-se a incubação com a lectina DBA e outro com a lectina DBA tratada previamente com n-acetil galactosamina (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) a 0,1M.

4. RESULTADOS

4.1 - Citoquímica da lectina DBA

As cinco linhagens de camundongos isogênicas Balb/c, DBA2, CBA-J, SJL e C57, além da Swiss testadas pela citoquímica com lectina DBA, apresentaram células positivas distribuídas na região mesometrial (Fig. 1). O mesmo padrão de marcação foi observado em todas as linhagens, isto é, o conteúdo dos grânulos foi seletivamente marcado, assim como a superfície celular das NK-u (Fig. 2). Nos cortes de órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo) não foram detectadas reações positivas em linfócitos (Fig. 3 e 4). Na reação controle realizada com a adição do açúcar inibidor da lectina DBA, o N acetil-D-galactosamina, a reação com a lectina foi completamente inibida (Fig.5)

4.2 - Isolamento de células NK-u

O método de isolamento celular, por meio de esferas biomagnéticas conjugadas com lectina DBA, permitiu a obtenção de 6 a 8×10^3 células por sítio de implantação (Fig. 6). Estas células ainda aderidas às esferas biomagnéticas, submetidas à reação com a lectina DBA biotinada apresentaram-se positivas. Após a adição da N-acetil D-galactosamina, as células desassociadas das esferas biomagnéticas mostraram-se aparentemente íntegras e viáveis, além de manterem a reatividade pela lectina DBA (Fig 7).

4.3 - Imunização de camundongos

Os soros dos animais imunizados foram testados por imunocitoquímica. Nos primeiros testes não foi detectada a presença de anticorpos contra as células NK-u em 4 dos 6 animais imunizados, sendo que em 2 animais, a resposta foi detectada, porém em grau muito baixo, não sendo considerada. Após um período de aproximadamente 3 semanas, uma nova etapa de imunização foi iniciada, utilizando os 2 animais que apresentaram uma resposta imune sutil. O mesmo esquema de inoculação foi utilizado, sendo dobrada a concentração de células NK-u inoculadas. Nesta segunda etapa de imunização, detectou-se no soro de um dos animais imunizados, o aumento crescente no título (1:160) de anticorpos contra as células NK-u. Após 7 dias da 3ª dose intraperitoneal, este animal recebeu mais uma dose intraperitoneal de células NK-u isoladas, sendo sacrificado para coleta das células esplênicas.

O soro deste animal, utilizado em reação imunocitoquímica, apresentou intensa reação específica na superfície das células NK-u (Fig. 8), com ausência de marcação em células linfocitárias de baço.

Os soros pré-ímmunes, assim como os dos outros 4 animais inoculados, apresentaram-se negativos nas reações imunocitoquímicas realizadas.

4.4 - Obtenção de hibridomas contendo anticorpos anti-NK-u

A fusão das células esplênicas (2×10^7 células), obtidas do animal soro-positivo para as células NK-u, com as células de mieloma SP2 (3×10^7 células), segundo protocolo preconizado por FASEKAS DE ST GROTH & SCHEIDEGER (1980) resultou em crescimento celular em 100% dos poços das 3 placas onde foram semeadas. Conforme analisado 10 dias após a fusão, os sobrenadantes dos poços testados pelo método imunocitoquímico, em cortes histológicos, demonstraram que aproximadamente 50% destes hibridomas apresentaram reações positivas. Porém, parte das culturas teve de ser descartada por apresentar contaminação por fungos.

Pela triagem baseada no padrão de reatividade em imunocitoquímica (intensidade e especificidade sobre as células NK-u), as culturas 1B1, 1C4, 2C4 e 2C6 foram consideradas positivas para prosseguir nos procedimentos de clonagem.

Para a clonagem utilizou-se a técnica de diluição limitante, lançando-se, nas placas, 5 células/poço. Os resultados obtidos após a clonagem estão resumidos na Tabela 1. Além de clonadas essas culturas foram expandidas e apropriadamente preservadas em nitrogênio líquido.

Tabela 1: Crescimento celular após a clonagem.

Cultura	% poços com crescimento	% poços com crescimento de 1 único clone
1 B1	83.3%	26.3%
1 C4	92.7%	25.8%
2C4	83.3%	39.4%
2C6	57.3%	58.2%

Em todas as placas de clonagem foram encontrados poços com crescimento de um único clone, embora a eficiência da clonagem em alguns experimentos não tenha sido muito elevada (culturas 1B1 e 1C4). Os sobrenadantes destes hibridomas, testados em reações imunocitoquímicas, apresentaram diferenças quanto à eficiência, isto é, dos clones originados da cultura 1C4, apenas 16,7% apresentaram reatividade com as células NK-u, enquanto a cultura 2C4 apresentou a maior percentagem, atingindo 78,6%. Os resultados obtidos nos testes imunocitoquímicos estão resumidos na Tabela 2.

Os sobrenadantes que apresentaram reação positiva para as células NK-u nos testes imunocitoquímicos mostraram 2 tipos de padrão de marcação, quais sejam: os anticorpos do clone 2C4 marcaram intensamente a superfície e conteúdo citoplasmático (Fig. 9) e os anticorpos dos clones 1B1, 1C4 e 2C6 marcaram apenas o conteúdo citoplasmático das NK-u (Fig. 10).

Todos os híbridos clonados apresentaram clones positivos com produção de anticorpos reativos às células NK-u, porém um deles, que apresentou baixa percentagem de positividade, não foi expandido.

Tabela 2: Culturas secretoras de anticorpos anti-NK-u após a clonagem

Cultura	Nº de culturas com 1 clone/poço	Nº de culturas testadas	% de clones produtores de anti-NK-u
1B1	21	26	57.7%
1C4	23	24	16,7 %
2C4	32	28	78.6%
2C6	32	35	71.4%

Para a expansão, foram escolhidos os clones que apresentaram, além da especificidade, maior intensidade de marcação, em testes imunocitoquímicos, para as NK-u. Os clones inicialmente selecionados foram : 1B1(3G4 e 3G8), 2C4 (1A12, 1A11, 1C10, 1H10, 1C4, 1B1, 1C1, 1F2 e 5A10) e 2C6 (2B9, 2D4 e 2E4).

Durante as etapas de expansão dos clones selecionados que passaram inicialmente por placas de 24 poços e, subseqüentemente, para frascos de cultivo T-25 e para frascos T-75, a capacidade de secretar anticorpo foi acompanhada por meio de testes imunocitoquímicos. Destes, aqueles oriundos de 2C4 e 2C6 foram os que mantiveram maior intensidade de reação com as células NK-u em testes imunocitoquímicos realizados em cortes histológicos. Ao final, as células correspondentes a cada clone foram adequadamente criopreservadas, à medida que eram obtidas quantidades de células suficientes. Para cada um dos clones foram criopreservadas entre 5 e 10 ampolas.

A isotipagem realizada nestes clones selecionados caracterizou todos como pertencentes ao isotipo IgM, positivos para a cadeia leve Kappa.

4.5 – Indução de ascite para produção de anticorpos monoclonais

Dentre os clones que mantiveram reatividade pelas células NK-u nos testes imunocitoquímicos, foram selecionados 4 que apresentaram maior intensidade de reação, quais sejam: 2C4.1C10, 2C4.5A10 (marcação na superfície e citoplasma das NK-u) e 2C6.2B9, 2C6.2E4 (marcação no citoplasma das NK-u). Estes quatro clones selecionados e inoculados em camundongos Balb/c produziram tumores ascíticos. A presença dos anticorpos, assim como os títulos destes foram determinados por meio de

testes imunocitoquímicos e imunoquímicos.

4.6 – Testes imunocitoquímicos e imunoquímicos

O líquido ascítico produzido pelos clones 2C4.1C10, 2C4.5A10, 2C6.2B9 e 2C6.2E4 testados em reações imunocitoquímicas, manteve, respectivamente, marcação positiva na superfície e/ou no citoplasma das NK-u até a titulação de 1:1000. Nos testes imunocitoquímicos realizados em cortes de órgão linfóides, foi observada marcação fraca na superfície de algumas células, da região cortical do timo, de algumas células dispersas no linfonodo e marcação ausente no baço.

No *Western Blotting*, os clones 2C4.1C10 e 2C4.5A10 (marcação na superfície e citoplasma das NK-u) apresentaram reação positiva em três bandas com os seguintes pesos moleculares: 52,0 KDa, 53,8 KDa e 77,7 KDa, sendo que duas apresentaram correspondência com bandas positivas à lectina DBA (52,0 KDa, 53,8 KDa). Os clones 2C6.2B9 e 2C6.2E4 (marcação no citoplasma das NK-u) apresentaram reação positiva em 2 bandas, 41,4 KDa e 89,3 KDa, sendo que 1 apresentou correspondência com bandas positivas à lectina DBA (41,4 KDa) (Fig. 11).

5. DISCUSSÃO

A lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutin*), quando utilizada em técnicas citoquímicas, demonstra afinidade altamente seletiva para com as células NK presentes no ambiente uterino de camundongos (Stewart e Webster, 1997; Corrêa da Silva, 1997, Paffaro Jr et al., 1999). Esta lectina reage com glicoconjugados contendo N-acetil-D-galactosamina terminais expressos tanto na superfície celular das NK-u, quanto com o conteúdo de seus grânulos (Corrêa da Silva, 1997), tornando-a uma importante ferramenta na identificação das células NK-u. Tal padrão de reatividade também foi encontrado nas células NK-u de camundongos da linhagem Swiss processados no presente trabalho, corroborando com os achados anteriores.

Sabidamente, as lectinas não podem ser consideradas como marcadores específicos de uma determinada população celular, uma vez que a especificidade da reação destas moléculas advém do reconhecimento de monômeros de açúcares, que podem estar associados a diferentes glicoconjugados (Damjanov, 1987). Porém, podem ser utilizados como marcadores celulares seletivos em se limitando o conjunto do universo analisado. Neste sentido, a reatividade seletiva da lectina DBA descrita até então para as células NKu está limitada dentro do universo contido no útero de camundongos (Stewart e Webster, 1997; Corrêa da Silva, 1997; Damjanov e Damjanov, 1992).

Considerando-se que as células NKu pertencem à categoria de linfócitos, em nosso experimento estendemos as análises também aos órgãos linfóides para avaliar a presença de outras células reativas à lectina DBA. Pelas análises das reações citoquímicas realizadas com lectina DBA no timo, baço e linfonodo, constatou-se que nestes órgãos não foram encontradas células reativas à DBA. Por este resultado, pode-se estabelecer que a lectina DBA apresenta não apenas uma reatividade seletiva, mas também uma alta especificidade para com as células NKu no universo das diversas populações de células linfocitárias e, por conseguinte, constitui-se em um marcador celular de excelência para estas células. Além disso, é plausível supor que o glicoconjugado que contém o NacGal reconhecido pela lectina DBA poderia ser uma molécula de expressão específica das células NKu de camundongos.

Além disso, no presente trabalho, foram testadas 5 outras linhagens de camundongos isogênicos, quanto à presença de células NKu reativas à lectina DBA. Todas as linhagens de camundongos testadas apresentaram células NKu com igual

padrão, tanto de reatividade quanto de distribuição em relação aos observados nos camundongos heterogênicos Swiss. Embora não tenha sido realizada a avaliação sistemática em todas as linhagens possíveis de camundongos, pela constância do padrão de reação entre as células NK-u das linhagens testadas, presume-se que os glicoconjugados reativos à lectina DBA sejam de expressão comum às NK-u desta espécie animal.

Em se confirmando a constância da expressão destes glicoconjugados, reativos à lectina DBA, nas NK-u de camundongos de diferentes linhagens, pressupõe-se que os mesmos sejam de importância fundamental na fisiologia destas células. De acordo com Fonseca (2000), as células NKu são suscetíveis à ação da lectina DBA "in vitro", induzindo de imediato a reação de "capuz" na membrana plasmática. A exposição prolongada da NK-u à lectina DBA provoca a lise dessa célula, sugerindo que o glicoconjugado presente na superfície celular possa ser um importante receptor de membrana. Além deste relato, ainda não há qualquer outro sobre a natureza dos glicoconjugados lectina DBA reativos, expressos na superfície das células NKu.

A lectina DBA também reage intensamente com o conteúdo dos grânulos das NKu de camundongos (Correa da Silva et al, 1997). Da mesma forma, os grânulos das células NK ativadas obtidas do baço apresentam reação positiva, não apresentando porém, reação na superfície celular (Fonseca, 2000). Por outro lado, os grânulos das células NKu presentes nos sítios de embrião lesados perdem a reatividade para com a lectina DBA (Roman, 2001) enquanto mantêm a marcação na superfície celular.

Tais dados sugerem que os glicoconjugados reativos à DBA presentes na superfície celular devem ser diferentes daqueles encontrados no interior dos grânulos. Por conseguinte, enquanto o(s) glicoconjugado(s) contido(s) no(s) grânulo(s) podem ser comuns entre as NK esplênicas e uterinas, o(s) glicoconjugado(s) expresso(s) na superfície das NKu parece(m) ser altamente específico(s) desta população linfocitária. Esta é a primeira evidência direta de que as células NKu podem expressar moléculas específicas na superfície celular, as quais podem estar relacionadas com o seu comportamento peculiar no útero durante a gestação.

Por essas considerações, justifica-se o uso de células NK-u íntegras (no lugar de glicoconjugados isolados) como potencial inóculo imunogênico para indução da resposta imunológica do animal inoculado, contra o glicoconjugado de expressão específica na

superfície das células NKu de camundongos. A imunização com células NKu inteiras como inóculo antigênico foi utilizada por Stewart e colaboradores (1994), tendo o rato como animal receptor do inóculo. Segundo esses autores, o animal imunizado respondeu satisfatoriamente à produção de imunoglobulinas, que reconheciam as células NK-u. Porém, os anticorpos monoclonais obtidos por estes autores também reagiam com linfócitos T de forma indistinta. Tal resultado é perfeitamente compreensível, uma vez que a inoculação com antígenos interespecie deve resultar predominantemente em resposta imunológica, envolvendo o reconhecimento dos aloantígenos, por parte do sistema imune do receptor. Esta resposta majoritária acabou por camuflar e dificultar a identificação de outros clones que viessem a produzir anticorpos contra antígenos de menor expressão.

Na tentativa de contornar este problema, mas procurando induzir a produção de anticorpos para antígenos de expressão específica em células NKu foi idealizado um protocolo de imunização intraespécie, isto é, utilizaram-se camundongos machos da mesma espécie, como receptores do inóculo antigênico, que consistiu de células NK isoladas de camundongos prenhes.

Esta estratégia fundamentou-se no pressuposto de que a NK-u seria, de fato, uma população linfocitária específica, presente exclusivamente no útero de fêmeas prenhes, expressando moléculas de superfície que poderiam ser reconhecidas como não próprias pelo sistema imune do macho. As moléculas de expressão específica poderiam ser exatamente aqueles glicoconjugados reconhecidos pela lectina DBA.

Como inóculo antigênico neste experimento foram utilizadas células NKu isoladas e purificadas pelo método biomagnético, tendo as esferas magnéticas sido conjugadas com a lectina DBA.

A literatura cita vários procedimentos para se obter células NK-u isoladas. Dentre eles, o método descrito por Mukhtar e Stewart (1988), que faz cultura de explantes da glândula metrial. Stewart e colaboradores (1994) utilizaram este método para a obtenção de NKu, usadas como inóculo antigênico para obter anticorpos monoclonais em ratos. Por este método, além da quantidade de células NKu isoladas não ser muito grande, há um alto risco de contaminação com outras populações celulares (Fonseca, 2000). Kiso e colaboradores (1998) relataram o isolamento de células NK-u de glândula metrial de camundongos, usando esferas biomagnéticas conjugadas ao anticorpo anti-asialo-GM1.

Asialo-GM1 é um esfingosídeo presente no sistema nervoso central, que também é expresso na superfície da membrana de diversos leucócitos, inclusive as NK, não havendo, portanto, certeza quanto à pureza da população celular isolada com o uso deste marcador. Desta forma, a lectina DBA que apresenta alta afinidade e especificidade pelas células NK-u de camundongos torna-se um importante método para o isolamento e purificação destas células, quando conjugadas às esferas biomagnéticas. Por este método, pôde-se obter quantidades suficientes de células NK-u isoladas para o inóculo, uma vez que eram facilmente removidas das esferas com a adição do açúcar inibidor (NacGal) no meio de incubação. A especificidade da lectina DBA para com o N acetil- galactosamina é bem estabelecida (Wu e Sugii, 1998), sendo uma solução do açúcar a 0,1M, suficiente para deslocar a ligação entre a lectina DBA e os glicoconjugados da superfície celular das células NK-u. A adição da N-acetil-galactosamina também funciona como um "freio" na reação de associação, impedindo a progressão da ligação das esferas na superfície das células. A imunização usando células íntegras como antígeno, em métodos convencionais de inoculação intraperitoneal ou intravenosa, exige cerca de 10^6 células/inóculo como antígeno para induzir uma boa resposta imune (Cowley, 1995). O número de células NK-u isoladas, mesmo por meio do método biomagnético, é pequeno (em média 10×10^4 / animal doador). Por esta razão, a primeira inoculação foi feita diretamente no baço, região de proliferação dos clones de linfócitos B, o que supostamente permite uma sensibilização maior, mesmo com uma pequena quantidade de antígeno (Cowley, 1995). Conforme descrito em Resultados, dos 6 animais inoculados, apenas um mostrou produção de anticorpos específicos para as células NKu. A detecção desses anticorpos, assim como a elevação do seu título, foi realizada sempre pelo método imunocitoquímico em cortes histológicos e/ou células NKu isoladas. Cumpre salientar que as reações imunocitoquímicas realizadas em células isoladas e/ou em cortes histológicos apresentaram intensa reação inespecífica, mesmo com o soro de animal pré-imune. Tal padrão de reação era esperado, uma vez que o soro imune ou pré-imune obtido de camundongo era incubado com células NK-u e cortes histológicos também de camundongos, favorecendo reações inespecíficas. Após inúmeros testes realizados, as reações inespecíficas foram removidas, pela inibição/bloqueio das seqüências dos sítios que pudessem ser a causa das reações inespecíficas, tais como as imunoglobulinas e receptores Fc que se encontram

normalmente presentes na superfície das NKu, assim como distribuídas naturalmente nos tecidos de qualquer órgão.

Cabe salientar que, dentre os melhores resultados obtidos nas tentativas de solucionar o problema da reação inespecífica, o uso de microondas, segundo o princípio de Tornehave et al (2000) foi o que apresentou maior eficiência. Pelo protocolo de imunocitoquímica adotado, pode-se comprovar que o soro do animal imunizado utilizado contém anticorpos que reagem intensamente com antígenos presentes na superfície das células NKu.

Ao se atestar a especificidade do anticorpo contido no soro do animal para com as células NKu de camundongos, que atingiu o título de 1:160 no método imunocitoquímico, comprovou-se a premissa de que as células NKu seriam capazes de induzir à resposta imune intraespécie, pela expressão de antígenos específicos a esta população celular.

A especificidade do anticorpo policlonal produzido para as NKu pode ser atestada ainda pelas reações negativas observadas nos órgãos linfóides, como o baço, utilizado como controle. Outro controle foi feito em cortes histológicos de útero prenhe de camundongos da linhagem BALB/c, a mesma dos animais imunizados. A reação foi positiva, indicando que a resposta imune foi contra antígenos específicos das células NK-u e não contra antígenos da linhagem Swiss.

Na obtenção dos anticorpos monoclonais, foram selecionados aqueles que mantiveram reatividade para com as células NKu nos testes imunocitoquímicos. Nesta seleção foram evidentes dois padrões característicos de marcação, quais sejam: aquelas com reatividade somente no conteúdo citoplasmático e aquelas que marcavam tanto o citoplasma quanto a superfície celular. Quatro clones representativos destes padrões foram selecionados: 2C4.1C10, 2C4.5A10, 2C6.2B9 e 2C6.2E4 e inoculados em camundongos para a obtenção da ascite peritoneal.

A isotipagem realizada com o sobrenadante das culturas dos clones demonstrou que todos aqueles selecionados apresentaram imunoglobulinas do tipo IgM. Não se pode estabelecer as razões desta coincidência, nem tão pouco as razões precisas que induziram às células imunes na produção da imunoglobulina do tipo IgM, como resposta ao estímulo antigênico, mesmo após o prolongado período com repetidas inoculações do antígeno.

Os testes imunocitoquímicos realizados com as ascites dos clones demonstraram a manutenção dos padrões de marcação nas células NKu, isto é, os clones 2C6.2B9, 2C6.2E4 marcavam somente o citoplasma, enquanto os clones 2C4.1C10, 2C4.5A10 marcavam o conteúdo citoplasmático e a superfície celular, em títulos de até 1:1000. Pelo "western blotting", os anticorpos monoclonais derivados dos clones 2C6.2B9 e 2C6.2E4, marcavam as mesmas bandas: 41,4 KDa e 89,3 KDa, enquanto os clones 2C4.1C10 e 2C4.5A10 marcavam as bandas de 52,0 KDa, 53,8 KDa e 77,7 KDa. Por estes resultados presume-se que os clones provenientes da cultura 2C6 (2C6.2B9 e 2C6.2E4) sejam originários de um mesmo clone mãe, assim como os clones provenientes da cultura 2C4 (2C4.1C10 e 2C4.5A10). É importante salientar que os quatro anticorpos monoclonais identificaram bandas que têm correspondência com aquelas positivas para lectina DBA. Assim, presume-se que os anticorpos monoclonais que apresentaram reatividade na superfície das células NK-u possam estar reconhecendo a(s) mesma(s) molécula(s) que interagem com a lectina DBA.

Desta forma, como as células NKu isoladas do útero de fêmeas prenhes são capazes de induzir a resposta imune em machos da mesma espécie, comprova-se que estas células expressam antígenos não reconhecidos pelo macho. Isso implica em reconhecer que as células NKu sejam populações especiais de células NK, como vem sendo especulado, com base no seu comportamento peculiar. Porém, até o momento, esta afirmação não foi comprovada experimentalmente porque não foi identificado qualquer elemento específico das NKu, que pudesse ser correlacionado com uma função específica destas células na gestação. Pelas caracterizações iniciais realizadas com os anticorpos obtidos neste trabalho, em particular aqueles que reagem com a superfície celular, é possível que se tenha obtido marcadores específicos para as células NKu e os respectivos substratos antigênicos sejam moléculas de expressão exclusiva e relacionadas especificamente com a atividade desempenhada pelas NK-u na gestação.

Trabalhos subseqüentes serão realizados com o objetivo de caracterizar os antígenos detectados pelos anticorpos monoclonais anti-células NK-u.

6 - CONCLUSÕES

Com os procedimentos adotados e resultados obtidos no presente trabalho pode se concluir que:

- ◆ Os glicoconjugados reativos à lectina DBA foram detectados nas diferentes linhagens de camundongos testadas. Este resultado sugere que tais moléculas sejam de expressão universal nas células NK-u de camundongos.

- ◆ A imunização intraespécie com células NK-u íntegras, induziu uma resposta imune com a produção de anticorpos. Este fato corrobora a hipótese de que estas células são exclusivas do ambiente uterino.

- ◆ Foram obtidos anticorpos monoclonais pela técnica de hibridomas que apresentaram dois padrões distintos de reconhecimento das células NK-u. Um dos anticorpos foi capaz de marcar a superfície e citoplasma (anticorpos dos hibridomas derivados do clone 2C4). O outro marcou apenas o citoplasma (anticorpos dos hibridomas derivados do clone 2C6).

- ◆ Todos os anticorpos produzidos pelos hibridomas expandidos até o momento, foram isotipados como sendo IgM, cadeia Kappa.

- ◆ A correspondência dos anticorpos monoclonais com bandas lectina DBA positivas sugere que os substratos antigênicos, reconhecidos por estes anticorpos, sejam moléculas de expressão específica das NK-u.

7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de útero, no 9ºddg mostrando distribuição de células NK-u DBA positivas (seta) na região mesometrial do útero, de camundongos da linhagem C57BL/6. Células do estroma (cabeça de seta) 300 x.

Figura 2. Detalhe da fotomicrografia anterior, mostrando o padrão de reatividade das células NK-u pela lectina DBA (seta). Notar a reação positiva nos grânulos e na superfície celular das NK-u, e ausente nas demais células do estroma endometrial. 750 x.

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongo Swiss, mostrando ausência de reação nos linfócitos, pela lectina DBA. 200 x.

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico do timo de camundongo Swiss, mostrando ausência de reação nos linfócitos, pela lectina DBA. 420 x.

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de útero no 9ºddg. Reação controle da citoquímica da lectina DBA, com a adição de N-acetil-galactosamina 0,1M. Observar a inibição completa da marcação, tanto nos grânulos, quanto na superfície das células NK-u (cabeça de seta). 720 x.

Figura 6. Fotomicrografia de células NK-u isoladas e associadas à esferas biomagnéticas conjugadas com lectina DBA (seta). Microscopia de contraste de interferência diferencial. 350 x.

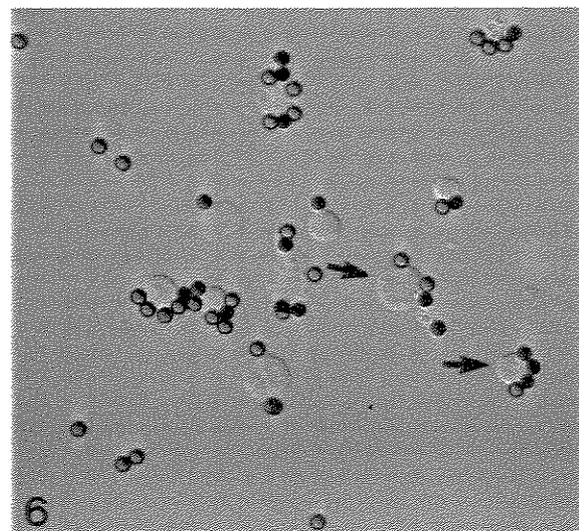
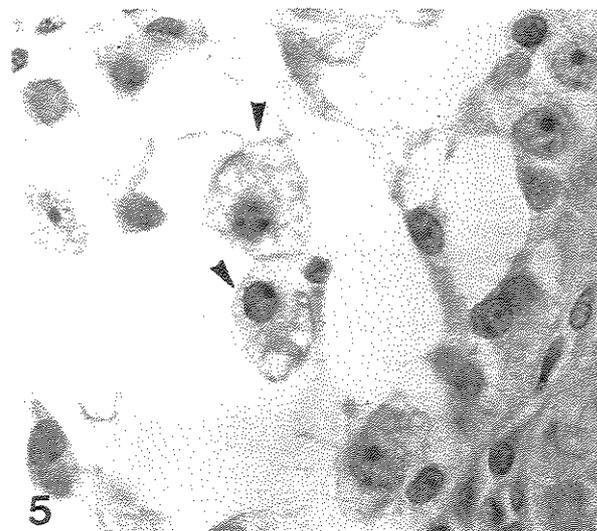
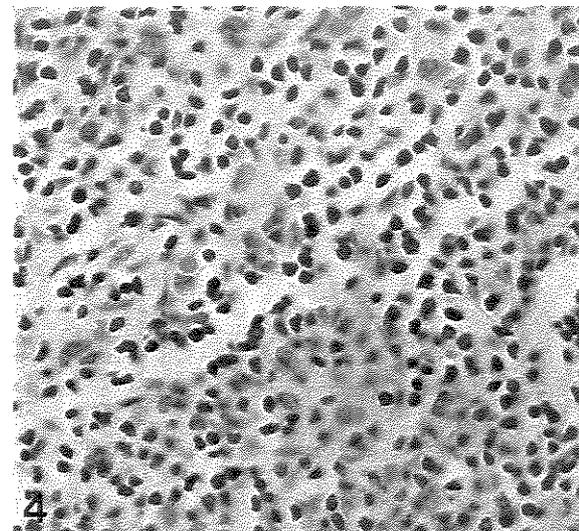
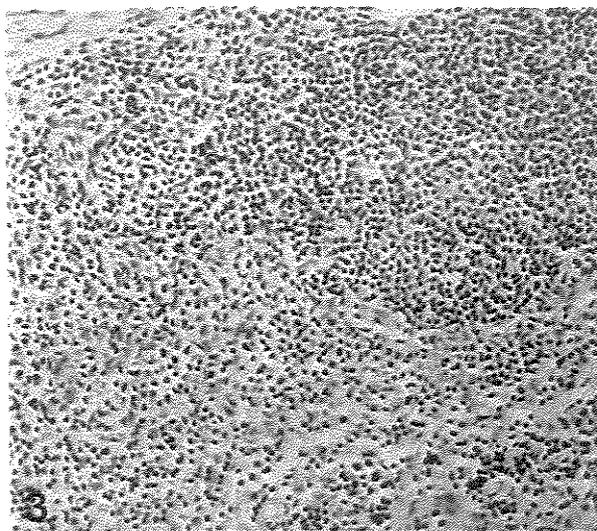
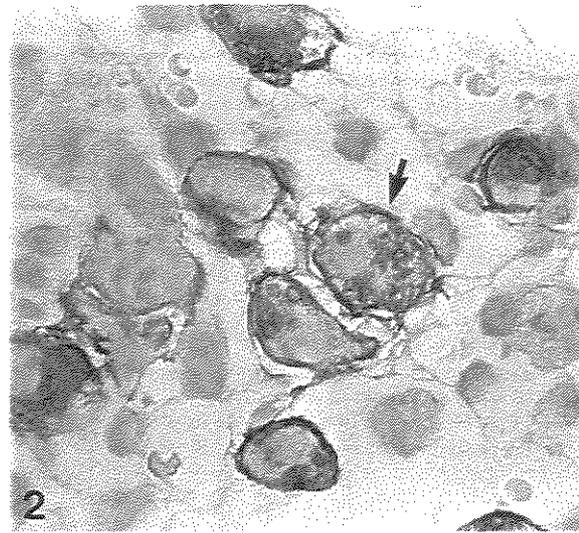
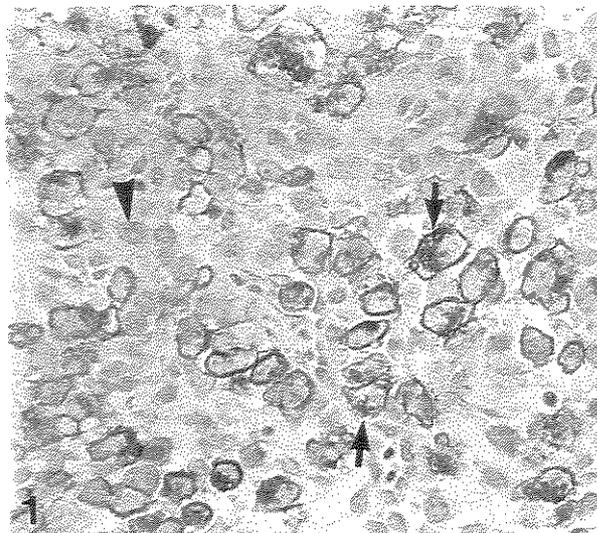


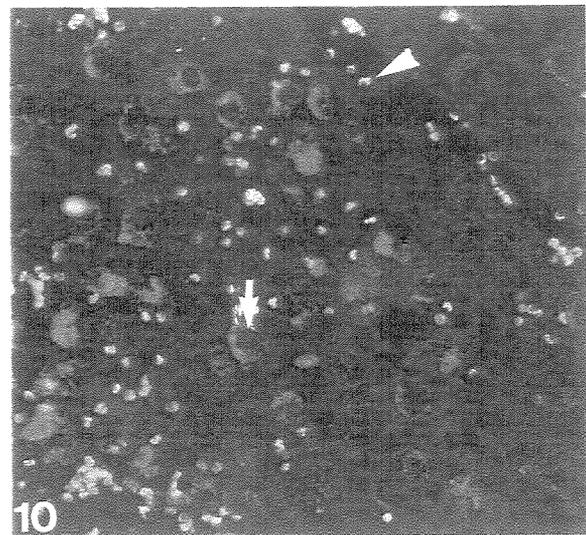
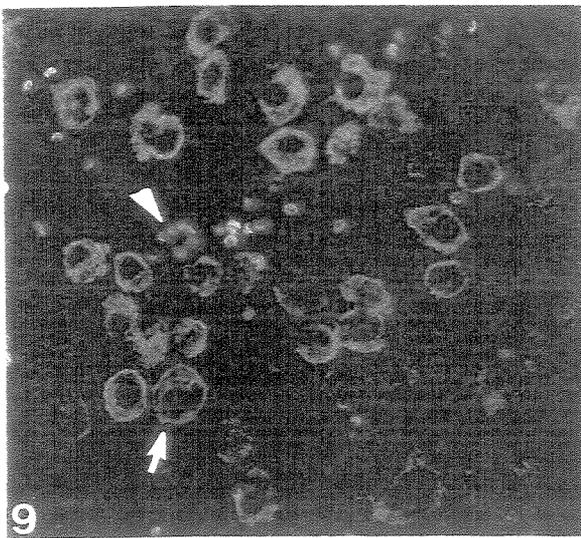
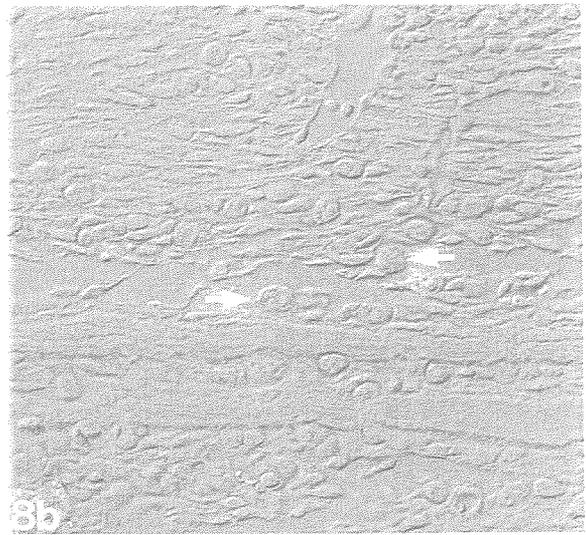
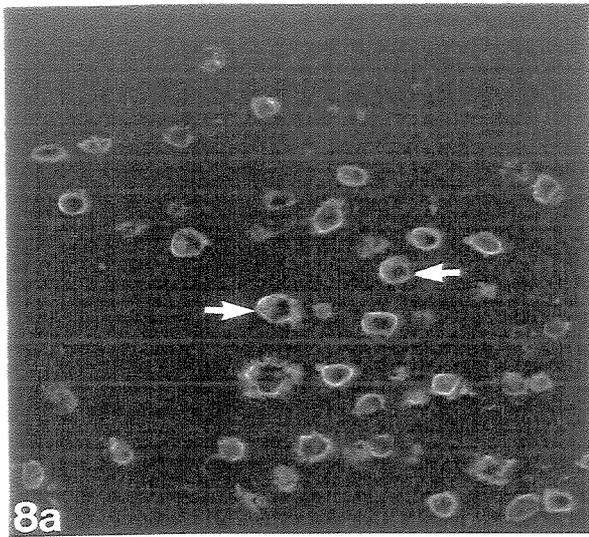
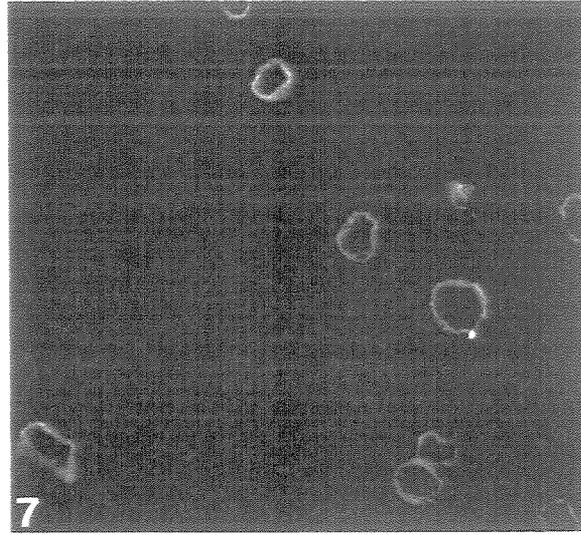
Figura 7. Fotomicrografia de células NK-u isoladas e purificadas, após desassociação com a adição de N-acetil-galactosamina. A totalidade das células isoladas apresentou reação positiva à lectina DBA, reveladas pela estreptoavidina-fluoresceína. Microscopia de fluorescência. 350 x.

Figura 8(a e b). Fotomicrografia de corte histológico de útero no 9ºddg submetido a reação imunocitoquímica com soro de animal imunizado. a) Microscopia de fluorescência mostrando intensa marcação na superfície celular de células NK-u (seta). b) imagem correspondente de a em microscopia de interferência, mostrando as células NK-u positivas (seta). 300 x.

Figura 9. Fotomicrografia de corte histológico de útero no 9ºddg submetido a reação imunocitoquímica com sobrenadante de cultura do clone 2C4.5A10. Observar a marcação delineando a superfície celular e no conteúdo citoplasmático de células NK-u (setas). Hemácias (cabeça de seta). Microscopia de fluorescência. 320 x.

Figura 10. Fotomicrografia de corte histológico de útero no 9ºddg submetido a reação imunocitoquímica com sobrenadante de cultura do clone 2C6.2D4. Observar a marcação apenas no conteúdo citoplasmático de células NK-u (seta). Hemácias (cabeça de seta). Microscopia de fluorescência. 320 x.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



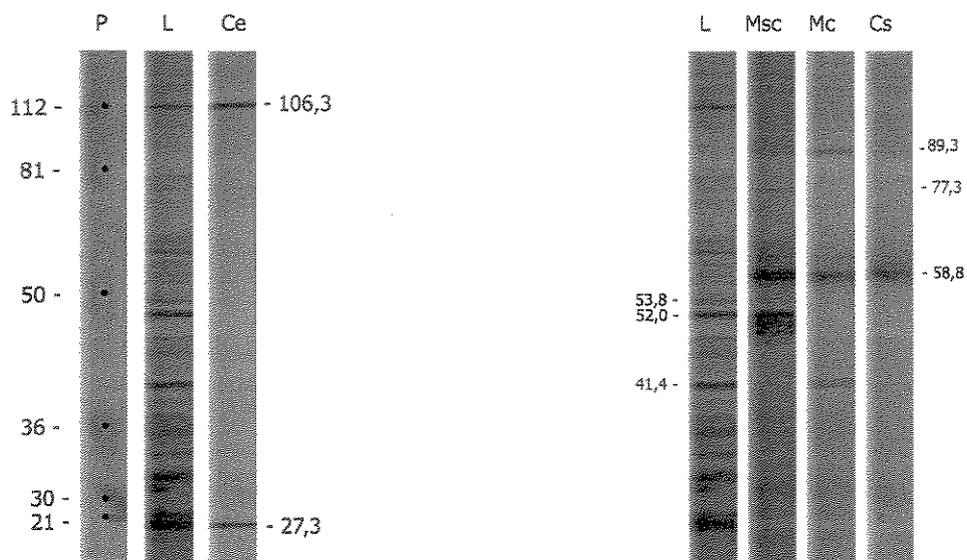


Figura 11. Padrão de reação imunoquímica com os anticorpos monoclonais e lectina DBA *in vitro*, do homogenado tecidual da glândula metrial de camundongos no 9º ddg, após SDS/PAGE e transferidas em membrana de nitrocelulose.

P – Padrão de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range);

L – Reação com lectina DBA biotinada/estreptoavidina peroxidase;

Msc - Reação com anticorpo monoclonal anti-NK-u (2C4.5A10)/anti-camundongo peroxidase;

Mc - Reação com anticorpo monoclonal anti-NK-u (2C6.2B9)/anti-camundongo peroxidase;

Ce – Reação controle com estreptoavidina peroxidase;

Cs - Reação controle com anticorpo secundário anti-camundongo peroxidase;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Ed.Revinter. cap. 1:3-13, 1998.
- ASHKAR, A.A. AND CROY, B.A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol. Reprod.*, 61:493-502, 1999.
- BRAGA, V.M.M. AND GENDLER, S.J. Modulation of Muc-1 expression in the mouse uterus during the cycle, early pregnancy and placentation. *J. Cell Sci.*, 105:397-405,1993.
- BULMER, D. Further studies on the granulated metrial gland cells of the pregnant rat. *J. Anat.*, 103:479-489, 1968.
- BERNARD, O., SCHEID, M.P., RIPOCHE, M.A., BENNETT,. Immunological studies of mouse decidual cells. 1. Membrane markers of decidual cells in the days after implantation. *J. Exp. Med.*, 148:580-591, 1978.
- BIASSONI, R., BOTTINO, C., MILLO, R., MORRETA, L., MORRETA, A. Natural killer cell-mediated recognition of human trophoblast. *Sem. Cancer Bio.*, 9:13-18,1999.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensinte method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- CUTURI, M.C., ANEGON, I., SHERMAN, F., LOUDON, R., CLARK, S.C.,PERESSUA, B., ET AL. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer. *J. Exp. Med.*, 169:569-83, 1989.
- CARRETERO, M., CANTONI, C., BILLON, T., BOTTINO, C., BIASSONI, R., RODRIGUEZ, A., PEREZ-VILLAR, J.J., MORETTA, L., MORETTA, A., LOPEZ-BOTET, M. The CD94 and NKG2-A Ctype lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.*, 27(2):563-567, 1997.
- CLARK, D.A., Controversies in reproductive immunology. *Crit. Rev. Immunol.*, 11:215-247, 1991.
- CORRÊA DA SILVA, C.R. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus musulus*) prenhes. Campinas: UNICAMP, 1997. 71p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

- CARDELL, R.R., HISAW, F.L., DAWSON, A.B. The fine structure of granular cells in the uterine endometrium of the rhesus monkey (*macaca mulatta*) with a discussion of the possible function of these cells in relaxin secreton. *Am. J. Anat.*, 124:307-340, 1969.
- CROY, B.A. AND KASSOUF, S. Evolution of the murine metrial gland for immunological function. *J. Reprod. Immunol.*, 15(1):51-69, 1989.
- CROY, B.A. Granulated metrial gland cells-interesting cells found in the pregnant. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 23:19-21, 1990.
- CROY, B.A., GUILBERT, L.J., BROWN, M.A., GOUGH, N.M., STINCHOMB, D.T., REED, N. AND WEGMANN, T.G. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J. Reprod. immunol.*, 19:149-166, 1991b.
- CROY, B.A., REED, N., MALASHENKO, B.A. AND KWON, B.S. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. *Cell. Immunol.*, 133:116-126, 1991c.
- CROY, B.A. AND KISO, Y. Granulated Metrial Gland Cells: A Natural Killer Cell subset of the pregnant murine uterus. *Microsc. Res. Tech.*, 25:189-200, 1993.
- CROY, B.A., STEWART, C.M., MCBEY, B.A., KISO, Y. An immunohistologic analysis of murine uterine T cells between birth and puberty. *J. Reprod. Immunol.*, 23:223-233, 1993.
- CROY, B.A., YU, Z.-M., KING, G.J. A review of the natural killer cell lineage in the uterus of the mouse and the pig. *J. Anim. Sci.*, 72:9-15, 1994.
- CROY, B.A., GUIMOND, M.J., LUROSS, J., HAHNEL, A., WANG, B., HEUVEL, M.V.D. Uterine natural killer cells do not require interleukin-2 for their differentiation or maturation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 37:463-470, 1997.
- COWLEY, J.V.G. Anticuerpos Monoclonales. Edición: Elfos Scientiae. 180 p., 1995.
- DAMJANOV, I. Biology of disease: lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.*, 57:5-20, 1987.
- DAMJANOV, A. AND DAMJANOV, I. Isolation of serine protease from granulated metrial gland cells of mice and rats with lectin from *Dolichos biflorus*. *J. Reprod. Fert.*, 95:679-684, 1992.
- DELGADO, S.R., MCBEY, B.A., YAMASHIRO, S., FUJITA, J., KISO, Y., CROY, B.A. Accounting the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leuk. Biol.*, 59:262-269, 1996.

- FAZEKAS DE ST. GROTH, S. & SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*, 35:1-21, 1980.
- FONSECA, P.M. Efeito das condições de cultivo primário sobre células NK uterinas (NKu) e avaliação da sua viabilidade *in vitro*. Campinas: UNICAMP, 2000. 101p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- GUILBERT, L., ROBERTSON, S.A., WEGMAN, T.G. The trophoblastics integral component of a macrophage cytokine network. *Immunol. Cell. Biol.*, 71:49-57, 1993.
- GUIMOND, M.-J., WANG, B., FUJITA, J., TERHORST, C., CROY, B.A. Pregnancy-associated uterine granulated metrial gland cells in mutant and transgenic mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 35:501-509, 1996.
- GUIMOND, M.-J., LUROSS, J.A., WANG, B., TERHORST, C., DANIAL, S., CROY, B.A. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in Tgs26 mice. *Biol. Reprod.*, 56:169-179, 1997.
- GUIMOND, M.-J., WANG, B., CROY, B.A. Immune competence involving the natural killer cell lineage promotes placental growth. *Placenta*, 20:441-450, 1999.
- HUNT, J. S. Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol. Reprod.*, 50:461-466. 1994.
- HARAGUCHI, C.M., BIZINOTTO, M.C., YAMADA, A.T. Expression of glycoconjugates containing N-acetyl-galactosamine by uterine natural killer cells. *Acta Microscopica.*, 8:277-278, 1999.
- HOUCHINS, J.P., LANIER, L.L., NIEMI, E.C., PHILLIPS, J.H., RYAN, J.C. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J. Immunol.*, 158(8):3603-3609, 1997.
- JONES, R.K., BULMER, J.N., SEARLE, R.F. Cytotoxic activity of endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle in humans. *Biol. Reproduc.*, 57:1217-1222, 1997.
- KISO, Y., TAKENAGA, K.K.; OKADA, T., MORIKAMA, Y., SASAKI, F. Isolation of granulated metrial gland cells a uterine form of natural killer cell by magnetic immunobeads/ particles. *J. Reprod. and Develop.* 44: 107-111, 1998.

- KING, A., BURROWS, T.D., HIBY, S.E., BOWEN, J.M., JOSEPH, S., VERMA, S., LIM, P.B., GARDNER, L., LE BOUTEILLER, P., ZIEGLER, A., UCHANSKA-ZIEGLER, B., LOKE, Y.W. Surface expression of HLA-C human extravillous trophoblast. *Placenta*, 21:376-387, 2000.
- KASSAI, M., IWAMORI, M., NAGAI, Y., OKUMURA, K., TADA, T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 10:175-180, 1980.
- KURAGO, Z.B., LUTZ, C.T., SMITH, K.D., 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.*, 160:1573-1580, 1998.
- LJUNGGREN, H.G. AND KARRE, K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today*, 11:237-244, 1990.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- LANIER, L.L., CHANG, C., AZUMA, M., RUITENBERG, HEMPERLY, J.J., PHILLIPS, J.H. Molecular and functional analysis of human natural killer cell associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD6). *J. Immunol.*, 146(12):4421-4426, 1991.
- LANIER, L.L. NK cell receptor. *Ann. Revs. Immunol.*, 16:359-393, 1998.
- LINNEMEYER, P.A., HAMILTON, M.S. A monoclonal antibody, 4h12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine deciduas. *J. Reprod. Immunol.*, 17:279-294, 1990.
- LINNEMEYER, P. A. AND POLLOCK, S. B. Murine granulated metrial gland cells at uterine implantation cells are natural killer lineage cells. *J. Immunol.*, 147:2530-2535, 1991.
- LAI, L., ALAVERDI, N., MALTAIS, L., MORSE III, H.C. Mouse cell surface antigens: Nomenclature and immunophenotyping. *J. Immunol.*, 160:3861-3868, 1998.
- MASON, L., GIARDINA, S.L., HECHT, T., ORTALDO, J., MATHIESON, B.J. LGL-1: a non-polymorphic antigen expressed on a major population of mouse natural killer cells. *J. Immunol.*, 140:4403-4412, 1988.
- MUKHTAR, D.D.Y AND STEWART, I.J. Migration of granulated metrial gland cells from cultured explants of mouse metrial gland tissue. *Cell Tiss. Res.*, 253:413-417, 1988.
- MUKHTAR, D.D.Y., STEWART, I.J., AND CROY, B.A. Leukocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, 15:269-279, 1989.

- MUKHTAR, D.D.Y. AND STEWART, I. Observations of the surface morphology of cultured granulated metrial gland cells. *J. Anat.*, 182:415-424, 1993.
- MANDELBOIM, O., MALIK, P., DAVIS, D.M., JO, C.H., BOYSON, J.E., STROMINGER, J.L. Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(10):5640-5644, 1999.
- NOMURA, S., WILLS, A.J., EDWARDS, D.R., HEATH, J.K., AND HOGAN, B. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J. Cell. Biol.*, 106:441-450, 1988.
- NAGLER, A., LANIER, L.L., CWIRLA, S., PHILLIPS, J.H. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.*, 143:3183-3191, 1989.
- PEREZ-VILLAR, J.J., CARRETERO, M., NAVARRO, F., MILERO, I., RODRIGUEZ, A., BOTTINO, C., MORETTA, A., LOPEZ-BOTET, M. Biochemical and serologica evidence for the existence of functionally distinct forms of the CD94 NK cell receptor. *J. Immunol.*, 157(12):5367-5374, 1996.
- PAFFARO-JR, V.A., JOAZEIRO, P.P., YAMADA, A.T. Differentiation stages of mouse u-nk cells and their distribution in the uterus during early pregnancy. *Acta Microscopica.*, 8:283-284, 1999.
- PARR, E.L., SZARY, A., PARR, M.B. Measurement of natural killer activity and target cell binding by mouse metrial gland cells isolated by enzymic or mechanical methods. *J. Reprod. Fertil.*, 88:283-294, 1990a.
- PARR, E.L., YOUNG, L.H.Y., 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.*, 145:2365-2372, 1990b.
- PARR, E.L., PARR, M.B., ZHENG, L.M. AND YOUNG, J.D.E. Mouse granulated metrial gland cells originate by local activation of uterine natural killer lymphocytes. *Biol.Reprod.*, 44:834-841, 1991.
- PARR, E.L., CHEN, H.L., PARR, M.B., HUNT, J.S. Synthesis an granular localization of tumor necrosis factor- α in activated NK cells in the pregnant mouse uterus. *J. Reprod. Immunol.*, 28:31-40, 1995.

- PEEL, S., STEWART, I.J., BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. *Cell Tissues Res.*, 233:647-656, 1983.
- PEEL, S., AND STEWART, I. The differentiation of granulated metrial gland cells in chimeric mice and the effect of uterine shielding during irradiation. *J. Anat.*, 139:593-598, 1984.
- PEEL, S. Granulated metrial gland cells. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 115:1-112, 1989.
- POLLARD, J.W. Lymphohematopoietic cytokines in the female reproductive tract. *Curr. Opin. Immunol.*, 3:772-777, 1991.
- REDLINE, R.W., AND LU, C.Y. Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship. *Lab. Invest.*, 61:27-36, 1989.
- ROMAN, S.S. Caracterização morfológica e comportamental das células NKu em camundongos após lesão embrionária induzida mecanicamente em diferentes períodos gestacionais. Campinas: UNICAMP, 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- STRAATSBURG, L.H., GOSSRAU, R. Comparative enzyme histochemistry of the early and term rat decidua with special attention to decidual regression. *Histochem. J.*, 26:239-251, 1994.
- STEWART, I.J., AND PEEL, S. Granulated metrial cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. *J. Anat.*, 135:111-118, 1981.
- STEWART, I.J. A morphological study of granulated metrial gland cells and trophoblast cells in the labyrinthine placenta of the mouse. *J. Anat.*, 139:627-638, 1984.
- STEWART, I.J. Granulated metrial gland cells in the mouse placenta. *Placenta.*, 11:263-275, 1990.
- STEWART, I.J. Granulated metrial gland cells: Pregnancy specific leukocytes? *J. of Leukocyte Biol.*, 50:198-207, 1991.
- STEWART, I.J. AND PEEL, S. Mouse metrial gland cells do not kill yac-1 myeloma cells. *J. Reprod. Immunol.*, 24:165-171, 1993.
- STEWART, I.J., MUKHTAR, D.D.Y., SAWYER, A.M., WILD, A.E. Monoclonal antibodies directed against surface and intracellular antigens of mouse granulated metrial gland cells. *J. Immunol. Methods*, 172:125-130, 1994.

- STEWART, I.J. AND WEBSTER, A.J. Lectin histochemical studies of mouse granulated metrial gland cells. *Histochem. J.*, 29:885-892, 1997.
- STEWART, I., AND PEEL, S. Mouse granulated metrial gland cell cytotoxicity of Wehi 164 cells: Is there a role for interleukin-3 and tumor necrosis factor- α ? *Am. J. Reprod. Immunol.*, 41:423-427, 1999.
- SELYE, H. AND MCKEOWN, I. Studies on the physiology of the maternal placenta in the rat. *Proc. R. Soc. London*, 119:1-31, 1935.
- SHULMAN, M., WILDE, C.D., KOHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, 276:269-270, 1978.
- TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.*, 47:187-376, 1989.
- TORNEHAVE, D., HOUGAARD, D.M., LARSSON, L.I. Microwaving for double indirect immunofluorescence with primary antibodies from the same species and for staining of mouse tissues with mouse monoclonal antibodies. *Histochem. Cell. Biol.* 113:19-23, 2000.
- VERMA, S., HIBY, S.E., LOKE, Y.W., KING, A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol. Reprod.* 62: 959-968, 2000.
- WANG, C., UMESAKI, N., NAKAMURA, H., TANAKA, T., NAKATANI, K., SAKAGUCHI, I., OGITA, S., KANEDA, K. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res.* 300:285-293, 2000.
- WARREN, H.S., KINNEAR, B.F., PHILLIPS, J.H., LANIER, L.L. Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL10, and IL-12. *J. Immunol.*, 154:5144-52, 1995.
- WARREN, H.S. NK cell proliferation and inflammation. *Immunol. Cell. Biol.*, 74:473 -480, 1996.
- WEGMANN, T.G., AND GUILBERT, L.J. Immune signaling at the maternal fetal interface and trophoblast differentiation – Review. *Dev. Comp. Immunol.*, 16:425-430, 1992.
- WISLOCKI, G.B., WEISS, L.P., BURGOS, L.H., ELLIS, R.A. The cytology, histochemistry and electron microscopy of the granular cells of the metrial gland of the gravid rat. *J. Anat.*, 91:130-140, 1957.

- WEBSTER, A.J. AND STEWART, I.J. Experimental evidence of secretion by mouse granulated metrial gland cells. *Placenta.*, 18: 465-468, 1997.
- WELSH, A.O., AND ENDERS, A.C. Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol. Reprod.*, 49:38-57, 1993.
- WU, A.M. AND SUGII, S. The molecular immunology of complex carbohydrates. *Advances in experimental medicine and biology. Plenum Press*, v 128, 868p., 1998.
- YE, W., ZHENG, L.M., YOUNG, J.D.E., LUI, C.C. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.*, 184:2405-2410, 1996.
- YELIAN, F.D., EDGEWORTH, N.A., DONG, L.J., CHEENG, A.E., ARMANT, D.R. Recombinant entaction promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the arg-gly-asp (RGD) recognition sequence. *J. Cell. Biol.*, 121:923-929, 1993.
- YOKOYAMA, W.M., JACOBS, L.B., KANAGAWA, O., SHEVACH, E.M., COHEN, D.I. A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. *J. Immunol.*, 143:1379-1386, 1989.
- YOKOYAMA, W.M., SEAMAN, W.E. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: The NK gene complex. *Annu Ver. Immunol.*, 11:613-635, 1993.
- ZHENG, L.M., OJCIUS, D.M., YOUNG, J.D.E. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 25:72-76, 1991b.