

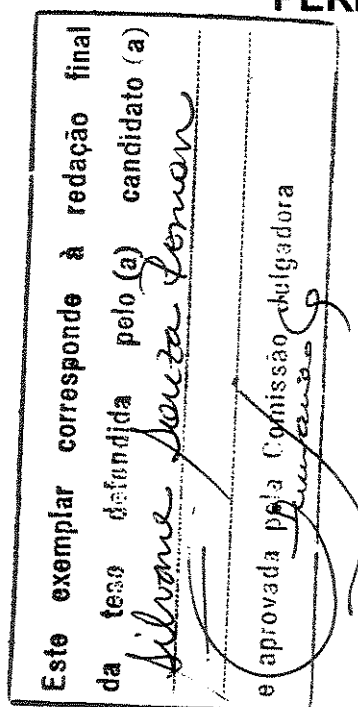


I

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Silvane Souza Roman

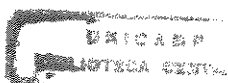
**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E COMPORTAMENTAL
DAS CÉLULAS NK_u EM CAMUNDONGOS APÓS
LESÃO EMBRIONÁRIA NOS DIFERENTES
PERÍODOS GESTACIONAIS**



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. Áureo Tatsumi Yamada



UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
R661c
V. _____ Es. _____
TOMBO BC/ 46908
PROC. 16-89-2101
C ☐ D ☒
PREC. R\$ 11,00
DATA 02/11/01
N.º CPD _____

ii

CM00161036-6

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

Roman, Silvane Souza

R661c Caracterização morfológica e comportamental das células NKu
em camundongos após lesão embrionária nos diferentes períodos
gestacionais/Silvane Souza Roman. --Campinas,
SP:[s.n.], 2001
96f.:ilus.

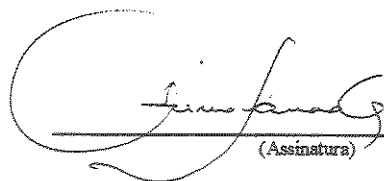
Orientador: Áureo Tatsumi Yamada
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Células killer. 2. Trofoblasto. 3. Biologia da Reprodução-. 4. Útero.
5. Embrião. I. Yamada, Áureo Tatsumi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

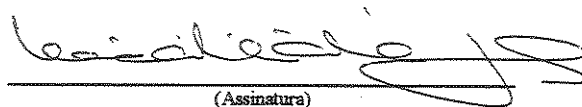
Data da defesa: 02/08/2001

Banca Examinadora

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)


(Assinatura)

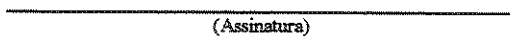
Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


(Assinatura)

Prof. Dr. Ricardo Barini


(Assinatura)

Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz


(Assinatura)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*«Não é o desafio com que nos deparamos
que determina quem somos e o que estamos nos tornando,
mas a maneira com que respondemos ao desafio.
E, enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso.*

(Henfil)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

"A vida nos foi ofertada por Deus para que a empregemos em benefício da humanidade."

(Giuseppe Mazzini)

Aos meus pais,

Argemiro e Oraides.

Por terem ensinado como viver.

Por terem mostrado o verdadeiro significado de família.

Pelo incentivo e força nos momentos de decisão e desânimo em minha vida.

Pelo apoio e principalmente o amor que me foi dado!

Agradecimentos

Ao Valdecir, Marinês, Claudemir, Ivo, Elizete, Aline, Igor e Mateus, minha família, pelo apoio e incentivo nesta caminhada, e por me fazerem acreditar que a vida não falhará enquanto houver amor, em especial, a João, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e alegres de minha vida e principalmente por ter paciência, cumplicidade e amor.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pela orientação segura e dedicação empenhada na minha formação científica e acadêmica.

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. Maria Cristina Marcondes (Depto. Fisiologia, IB/UNICAMP), Profa. Dra. Sima Katz (Depto. Histologia, EPM/UFESP), Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel (Depto. Biologia Celular, IB/UNICAMP) pela análise prévia criteriosa e valiosa sugestões para aprimoramento desta tese.

Aos camundongos, que deram as suas vidas para a realização deste trabalho.

Aos Docentes do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia/UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas e científicas, em especial, à Profa. Dra. Ivanira Bechara, pela amizade, apoio, carinho, auxílio didático, companheirismo e principalmente pelo incentivo constante; à Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon, pela amizade e principalmente ao auxílio que foi dado na descrição do primeiro relatório; à Profa. Dra. Sarah Arana, pela atenção, apoio, carinho, sugestões didáticas e amizade; ao Prof. Dr. Luiz pelo auxílio nas fotos macroscópicas, bem como na amizade, colaboração e carinho; ao Prof. Dr. Paulo Joazeiro, pelo auxílio didático e técnico, atenção e incentivo.

Ao Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica e ao Laboratório de Criométodos e Embriologia Experimental do DHE/IB/UNICAMP, onde foi realizada a maior parte dos experimentos.

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

Ao Prof. Heitor Verardi, Profa. Maristela Siviero, Profa. Vera Haas e Profa. Lorena Geib, da Universidade de Passo Fundo, pelo estímulo e oportunidades de novos conhecimentos, além de, incentivo constante, apoio, carinho, atenção e por terem sempre torcido por mim.

Às amigas Nara, Mararrubia, Raquel, Rocheli, Neusa, Terezinha, mesmo que distantes sempre estiveram comigo, incentivando e alegrando através de e-mails calorosos.

Aos colegas e amigos Márcia, Junior, Suzana, Fabíola, Alex, Eliane, Débora, Monique, Marcelo, Analígia, Celina, Priscila, Junia, Tatiana, Silvana, Cibebe, César, Marcelo e Débora pela grande amizade e bons momentos compartilhados.

À Silvia, pela grande amizade e valiosa ajuda nos momentos mais difíceis.

À Dona Sônia, meus sinceros agradecimentos pelo carinho, atenção e preocupação.

Aos funcionários do DHE/IB/UNICAMP, Baltazar Pereira, Marta Almeida, Marta Beatriz, Raquel Viera e Cleusa Franco pelo carinho, amizade e inestimável auxílio técnico. À Claudinete, pelo auxílio técnico, colaboração e grande amizade.

Às secretárias, Helena, Rita e Beatriz, do Departamento de Histologia e Embriologia, e Lilian, Sidnei e Silvia, do Departamento de Biologia Celular, que de diversas maneiras colaboraram para a realização deste trabalho.

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

Por fim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

ITENS	PÁGINA
AGRADECIMENTOS	vi
ÍNDICE	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1- Endométrio de roedores na implantação	06
2.2- Outras populações celulares na decídua	06
2.3- Características gerais das células Natural Killer uterinas (NKu)	09
2.4- Funções das células NKu na interface materno-fetal	11
3- OBJETIVOS	16
3.1- Objetivo primário	17
3.2- Objetivos parciais	17
4- MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1- Obtenção de animais em período de gestação conhecida	19
4.2- Indução da lesão embrionária	19
4.3- Coleta e processamento do material	19
4.4- Análise macroscópica	20
4.5- Processamento para microscopia fotônica (MF)	20
4.5.1- Processamento histológico	20
4.5.2- Reações citoquímicas	20
4.5.2.1- Reação de PAS (Acido Periódico-Schiff)	20
4.5.2.2- Reação citoquímica com a lectina DBA (<i>Dolichos biflorus</i>)	21
4.5.3- Método para detecção de núcleo apoptótico	22
5- RESULTADOS	23
5.1- Análise macroscópica dos sítios de implantação	24
5.1.1-Incidência dos diferentes padrões de resposta hemorrágica nos sítios embrionários ao longo da gestação	24
5.2- Análise em microscopia fotônica (MF)	26
5.2.1- Sítios de implantação em camundongos	26
5.2.2- Identificação das células NKu pelo PAS e Lectina DBA	27
5.2.2.1- Animais controles	27

5.2.2.2- Animais experimentais	28
5.3- Análise da incidência de células NKu nos sítios lesados	29
5.4- Detecção de núcleo apoptótico	38
6- DISCUSSÃO	43
7- CONCLUSÕES	56
8- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	58
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

RESUMO

As células Natural Killer participam da resposta imune inata por meio da sua ação citolítica sobre células alvos que expressam antígenos de superfície não reconhecidos como próprios ou anormais. A capacidade citolítica é atribuída à liberação do seu conteúdo granular, que contém, além de perforina, granzimas e outras enzimas hidrolíticas. Durante a gestação são encontradas elevadas incidências de células NK no útero (NKu), que apresentam comportamento peculiar e distinto das células NK do sangue circulante (NKc). Se por um lado tem sido comprovado que, a célula NK atua na manutenção da homeostasia e equilíbrio do ambiente uterino durante a gestação, por outro lado, não há dados que demonstrem a atividade citolítica ou citotóxica das NKu na gestação normal, ou, se esta pode ocorrer em situação de anormalidade.

O presente trabalho teve o intuito de estabelecer um modelo experimental que induz uma anormalidade na gestação para avaliar o comportamento das células NKu nestas condições. Para tanto foram realizadas lesões dos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal por meio de perfuração dos sítios com agulha hipodérmica em animais nos 6º, 8º, 10º, 12º, 15º e 17º dias de gestação. Amostras de sítios lesados e não lesados foram coletadas nos intervalos de 6 e 24 horas pós-lesão para análises macroscópicas e microscópicas. Nas análises microscópicas, os materiais foram processados pelas técnicas histológicas rotineiras de parafina e submetidos às reações histoquímicas de PAS e lectina DBA (*Dolichos biflorus*), assim como pelo TUNEL.

Pelas análises macroscópicas, foram verificadas ocorrências de hemorragias de diferentes intensidades classificadas como sendo de tipos: lateral (HL), mesometrial (HM), generalizada (HG) e atrófica (HA), de incidências tanto nos sítios submetidos à lesão primária quanto nos adjacentes não manipulados.

Nas análises microscópicas dos cortes submetidos às reações histoquímicas, foram encontradas células NKu com alterações morfológicas nos sítios com HM, HG e HA, porém, não naqueles encontrados nos sítios HL e normais. As alterações das NKu foram classificadas em categorias de I a VI, baseando-se no padrão de reatividade pela lectina DBA encontrada na superfície celular e/ou no conteúdo granular. Dentre as alterações das NKu, chamou maior atenção aquela com ausência de marcação no conteúdo granular. As incidências de células NKu com estas alterações variaram tanto ao longo da gestação, quanto nas áreas em que se encontravam nos sítios hemorrágicos. Ressalta-se a coincidência dos períodos em que foram encontradas maiores incidências de

hemorragias nas regiões (HM, HG e HA), com os períodos de maior incidência de células NKu apresentando alterações. Não foi encontrado aumento significativo na incidência de células NKu com núcleo apoptótico, porém as células trofoblásticas mostraram marcações positivas em maior proporção no período de 24 horas pós-lesão.

Os resultados obtidos, demonstram que a lesão embrionária ou fetal provoca desequilíbrio acentuado no ambiente uterino, acarretando em hemorragias de diferentes intensidades, onde foram encontradas células NKu de morfologias alteradas. As alterações encontradas nas células NKu sugerem a ocorrência da liberação do seu conteúdo lítico. O fenômeno da degranulação ocorre em células NKu diferenciadas sem acarretar na auto-degeneração, podendo o seu conteúdo granular ser restaurado. O provável efeito da liberação do conteúdo lítico pelas células NKu pode estar relacionado com o aumento de células trofoblásticas com núcleo apoptótico no período de 24 horas pós-lesão, conforme determinado pelo teste de TUNEL. O fato de terem sido encontradas as mesmas alterações também nos sítios não submetidos à lesão, faz pressupor um efeito sistêmico decorrente da lesão. Além disso, a coincidência do período em que se verificam as hemorragias mais acentuadas nos sítios de maior incidência das NKu com alterações, configura uma relação direta entre os dois fenômenos decorrente da gestação anômala.

ABSTRACT

The Natural Killer cell shares in the innate immunity by targeting its cytolytic activity against cells expressing non-self or abnormal MHC class I antigens. The cytolytic capability is related to perforin, granzymes and hydrolytic enzymes contents of the granules that once released induces apoptosis of target cells. However, the NK cell found in the pregnant uterus (uNK) shows peculiar and distinct behavior if compared with those collected from circulating blood (NKc). One of intriguing question in the immunology of reproduction is the presence of such a killer cell which does not trigger the lytic activity neither *in vitro* nor in the pregnant uterus.

The present work aimed to establish an experimental model of abnormal pregnancy in the mouse to evaluate the uNK cell behavior. In order to, it was performed mechanical lesion of embryo or fetus from 6^o to 17^o days of pregnancy (dp). Samples of damaged and undamaged uterine sites were collected at 6 and 24h after and evaluated by naked eye. The desired uterine samples were processed for conventional paraffin embedding, sectioning and staining with PAS or DBA (*Dolichos biflorus*) lectin cytochemistry, as so as, for TUNEL method.

Both damaged and undamaged uterine sites showed hemorrhages that were classified as lateral (LH), mesometrial (MH), general (GH) and atrophic (AH) according to intensity and localization. The uNK cells found in uterine sites with the MH, GH and AH showed changes of morphology and DBA lectin reaction patterns which were classified in the range from I to VI. Among the changes, those uNK showing lost of DBA reactivity in the granules contents (class I) attract special attention. The distribution of such an altered uNK cells varied both along the gestation period and localization in the uterine sites with hemorrhage. The higher incidence of uNK presenting alterations coincides with those periods of higher incidences of hemorrhages in the mesometrial region. No significant increase of apoptotic uNK amount was detected in the damaged samples but the increased amount of trophoblast cells with labeled nuclei with TUNEL method was seen 24hs after lesion.

Therefore, the embryo or fetus lesion induces the environment unbalance of respective and adjoining uterine sites eliciting the hemorrhage of different intensities, where were found morphologically abnormal uNK cells. The morphological changes found in the uNK cells suggest the occurrence of granules contents releasing by fully differentiated cells without self-degeneration and the granules contents being probably

restored in. The increasing of trophoblast apoptosis found at 24h after lesion could be the effect of cytolytic activity of uNK cell. Since the same profiles of alterations were found in the undamaged uterine sites, the effect of lesion seems to affect systemically the uterus. Furthermore, the coincidences between the periods of higher hemorrhage and higher incidences of mature uNK cell, suggest a direct relation between them in the abnormal pregnancy.

1- INTRODUÇÃO

A implantação embrionária em roedores tem início com o íntimo contato entre a membrana plasmática do blastocisto e do epitélio luminal que prossegue com a gradual penetração do trofoblasto para o interior do estroma endometrial (ENDERS, 1965; BEVILACQUA and ABRAHAMSOHN, 1989; ENDERS and WELSH, 1993). Ao redor da metade do período de gestação verifica-se a formação da placenta definitiva que compartilha o suprimento sanguíneo materno para suprir a demanda do desenvolvimento e crescimento fetal (AMOROSO, 1952).

O sucesso da implantação do embrião e do desenvolvimento do feto que se hospeda no ambiente uterino envolve um conjunto de mecanismos complexos, considerando-se particularmente a diversidade genética do conceito que não induz à rejeição imunológica por parte do hospedeiro.

Contribui para esta transparência imunológica o fato das células trofoblásticas expressarem apenas antígenos de superfície das classes HLA-G, HLA-C e HLA-E (KING, 1999). A ausência de HLA-A nas células trofoblásticas, por sua vez, não induziria à resposta imunológica clássica envolvendo linfócitos T (AVRIL et al, 1999). Isso explica, em parte, o desaparecimento destes linfócitos do útero durante a gestação (HUNT et al, 2000). Por outro lado, é constantemente encontrada, neste ambiente, uma população de linfócitos NK, tanto em roedores (SELYE and MCKEOWN, 1935; STEWART and PEEL, 1977; BULMER et al, 1983; PEEL, 1989; HEAD, 1996-97; CROY et al, 1997) quanto em humanos (BULMER et al, 1991; KING et al, 1996-97).

Essas células, inicialmente conhecidas como grandes linfócitos granulados (LGL) em humanos (STARKEY et al, 1988; KING and LOKE, 1991; BULMER et al, 1991; KING et al, 1996-97; HUNT et al, 2000) e células granulosas da glândula metrial (GMG) em roedores (PEEL, 1989; STEWART, 1991; CROY and KISO, 1993), foram caracterizadas por meio da imunofenotipagem e, atualmente, são identificadas como pertencentes à linhagem NK, sendo denominadas, respectivamente, NK decíduais CD56^{bright}/CD16^{dim} (KING et al, 1998; LOKE and KING, 2000) e NK uterinas CD4⁻/CD8⁻/Ly49⁺/Asialo-GM-1⁺ (MUKHTAR et al, 1989; PARR et al, 1990; KARLHOFFER et al, 1992; KIMURA et al, 1995; WHITELAW and CROY, 1996; HELD and RAULET, 1997; ROTH et al, 2000).

A presença de linfócitos NK, conhecidos pela sua destacada atividade citolítica/citotóxica (TRINCHIERI, 1989; ZHENG et al, 1991a; KING et al, 1993; ZHENG et al, 1993; STEWART, 1998), tem sido motivo de especulações que tentam atribuir funções relacionadas com a gestação ou mesmo procurar uma razão para a sua presença.

À semelhança das NK encontradas no sangue circulante (NKc), as NK uterinas (NKu) produzem inúmeras citocinas, tais como: TNF- α (PARR et al, 1995; WHITELAW and CROY, 1996; GUIMOND et al, 1999), IFN- γ (PLATT and HUNT, 1998; ASHKAR and CROY, 1999; GUIMOND et al, 1999; CROY et al, 2000a), iNOS e eNOS (PARR et al, 1990; CROY et al, 1991b; GUIMOND et al, 1999; BURNET and HUNT, 2000), CSF-1 (CROY et al, 1991b; CHEN et al, 1993; CROY et al, 1996-97; GUIMOND et al, 1999), LIF (CROY et al, 1991b), GM-CSF (CUTURI et al, 1989; DRAKE and HEAD, 1994; JOKHI et al, 1994) e TGF-B1 (GRAHAM et al, 1992; CHENG et al, 1993). Da mesma forma, os seus grânulos contêm perforina (PARR et al, 1987; PARR et al, 1990; ZHENG et al, 1991a), granzimas (KING et al, 1993) e outras enzimas hidrolíticas (BULMER, 1963, 1968; CORRÊA DA SILVA, 1996; DELGADO et al, 1996). Nas NKc, este conteúdo granular está diretamente relacionado com a atividade citolítica destas células, que reconhecem como alvos as células cujas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apresentam alterações decorrentes de malignização ou infecções virais (GUMPERS and PARHAM, 1995; SU et al, 1998; COLONNA et al, 2000).

Se por um lado, a importância da síntese e secreção de citocinas tais como o eNOS e IFN- γ pelas NKu tenha sido comprovada na manutenção da homeostasia do ambiente uterino durante a gestação (CROY et al, 2000a; BURNET and HUNT, 2000), por outro lado, não há dados comprobatórios definitivos, quanto ao envolvimento das NKu em atividade citolítica ou citotóxica na gestação.

Os resultados frustrantes dos experimentos que tentaram avaliar a atividade citotóxica das NKu frente às células trofoblásticas (PEEL, 1989; HUNT, 1989; CROY, 1990; HUNT, 1990; KING and LOKE, 1990; STEWART, 1990), tumorais (STEWART and PEEL, 1999a) ou mesmo com células infectadas por vírus ou bactérias (ZHENG et al, 1991b; YOSHIZAWA et al, 1994; SÁNCHEZ et al, 1996) sugerem que a despeito da semelhança fenotípica com as NKc, as NKu seriam um subtipo de NK, com um mecanismo de controle de ativação peculiar. Conflui para esta hipótese o fato de não ter sido descrito, até o momento, qualquer indício de atividade citotóxica das NKu durante a gestação normal, exceto o indício indireto de que há maior incidência destas células nos casos de aborto recorrente de humanos (YOKOYAMA et al, 1994; VASSILIADOU and BULMER, 1998; FUKUI et al, 1999; VASSILIADOU et al, 1999; MIKI et al, 2000). Além disso em camundongos, as células NKu expressam glicoconjugados reativos à lectina *Dolichos biflorus* na superfície celular (CORRÊA DA SILVA, 1997), não encontrados em NK esplênico (FONSECA, 2000).

Por conseguinte, para a plena compreensão das funções desta subpopulação de célula NK faz-se premente estabelecer um modelo experimental que possa avaliar o seu comportamento em situação de desequilíbrio ou anormalidade na gestação.

2 - Revisão de literatura

2.1- Endométrio de roedores na implantação

No decorrer da implantação embrionária e prosseguindo para a fase de placentação, o endométrio sofre profundas modificações no tocante à sua celularidade e vascularização (ABRAHAMSOHN, 1983; WELSH and ENDERS, 1985, 1987; CROSS et al, 1994).

Os fibroblastos do estroma endometrial sofrem um fenômeno de transformação celular, referidos como decidualização (BEVILACQUA et al, 1991; APLIN and GLASSER, 1994), que resultam na modificação da forma, ultraestrutura e metabolismo destas células.

A reação decidual em roedores inicia-se no endométrio que circunscreve a área da implantação embrionária junto à cripta da luz uterina, na região antimesometrial (ENDERS, 1965; BELL, 1983; BEVILACQUA and ABRAHAMSOHN, 1989). Em camundongos este processo inicia-se ao redor do 5º dia de gestação (REINIUS, 1967; SCHLAFKE and ENDERS, 1975; BEVILACQUA and ABRAHAMSOHN, 1989; ZHENG et al, 1991b). À medida que se consolida a implantação e ocorre o crescimento embrionário, a reação decidual propaga-se centrifugamente no endométrio da região antimesometrial em relação ao embrião. Com a formação e crescimento do cone-ectoplacentário, agora a reação decidual propaga-se para a região mesometrial (ABRAHAMSOHN, 1983). À medida que ocorre a propagação da reação decidual na região mesometrial, a sua rede vascular torna-se mais proeminente e dilatada (WELSH and ENDERS, 1991), favorecendo a formação da placenta definitiva.

Durante o processo de decidualização, a matriz extracelular do estroma endometrial também sofre modificações estruturais com mudanças no colágeno e proteoglicanas (APLIN et al, 1988; ALBERTO-RINCON et al, 1989; APLIN and JONES, 1989; MYLONA et al, 1995; APLIN et al, 1998).

Atribuem-se à decídua as funções de conter a invasividade do trofoblasto (BEVILACQUA et al, 1991; APLIN and GLASSER, 1994), manter a ancoragem segura do blastocisto no endométrio na implantação, além de prover a nutrição do embrião (ABRAHAMSOHN, 1983) e produzir hormônios para a manutenção da gestação (LALA et al, 1986).

2.2- Outras populações celulares na decídua

No útero prenhe podem ser encontradas, além das células do estroma endometrial, populações transitórias de leucócitos (BULMER, 1995). Estas células atravessam a parede

dos vasos sanguíneos e linfáticos, podendo atuar contra infecções de microorganismos patogênicos.

No entanto, hormônios esteróides do ovário atuam sobre estes leucócitos, principalmente mantendo a viabilidade (progesterona) e promovendo a migração dos leucócitos dentro do útero (estrógeno). Neste mesmo período há um aumento de células NKu, macrófagos e eosinófilos (HUANG et al, 1995; GRIFFITH et al, 1997).

As funções específicas da subpopulação de leucócitos uterinos ainda estão pouco esclarecidas.

Os macrófagos são principalmente responsáveis pela produção de fatores de crescimento, citocinas e proteases, além de atuarem na destruição e remoção de células estranhas (HADDAD et al, 1995; SALAMONSEN, 1999; HUNT et al, 2000). Estudos realizados em camundongos mutantes mostraram que o fator estimulador de estrógeno e fator estimulador de colônias (CSF-1) contribuem para a diferenciação de macrófagos no útero (POLLARD et al, 1991). Na ausência destes fatores, os camundongos mantêm a mesma frequência de embriões implantados, porém, no período mais tardio da gestação aumenta o índice de reabsorção fetal. Observa-se ainda a redução do tamanho da ninhada, como também a diminuição do tamanho fetal e dos neonatos. Não ocorre alteração do peso da placenta, mas verifica-se o aumento das camadas do espongiotrofoblasto e do labirintotrofoblasto, enquanto as células glicogênicas da placenta tornam-se reduzidas (ROBERTSON et al, 1999).

Ao contrário dos demais tipos de leucócitos uterinos, os mastócitos uterinos têm importante papel durante o ciclo menstrual, responsável pela síntese e liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), estimulando as células do estroma endometrial a produzirem metaloproteases (SALAMONSEN, 1999).

O agregado de linfócitos B e T desaparece do útero, tornando-se difícil de ser identificado (HUNT et al, 2000).

Somente linfócitos da linhagem NK e os macrófagos tomam-se proeminentes (HUNT et al, 2000). Segundo estes mesmos autores, no útero há forças atrativas, como as quimocinas, fator estimulador de colônias-1 (CSF-1) e fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF), sintetizado pelas células epiteliais uterinas no período da pré-implantação e mais tarde durante a prenhez pelos leucócitos granulares e células do mesênquima da placenta (ROBERTSON et al, 1999).

No útero de mamíferos prenhes, incluindo-se os roedores, é encontrado um grupo de linfócitos granulares (LGLs), derivados da medula óssea (WHITELAW and CROY, 1996;

STEWART, 1998). Em roedores, estes LGLs formam um agregado linfóide transitório denominado glândula metrial, o qual se desenvolve entre a musculatura uterina e o endométrio decidualizado (CROY and KISO, 1993). Pela sua localização e conteúdo de grânulos citoplasmáticos PAS positivos, as células localizadas nesta região foram anteriormente denominadas células granulosas da glândula metrial (GMG) (STEWART and PEEL, 1977; STEWART and PEEL, 1980; WOOD et al, 1988; CROY, 1990; CLARKE, 1994; DELGADO et al, 1996).

Estudos baseados no imunofenótipo e constituição dos grânulos das células GMG em camundongos têm comprovado que estas células pertencem à linhagem Natural Killer (NK) (CROY, 1990; CROY et al, 1991b; PARR et al, 1991; ZHENG et al, 1991b). A denominação inicial de GMG foi substituída pela denominação de células NK uterinas (NKu) pelas sucessivas comprovações da sua similitude com as NK do sangue circulante (NKc) (MUKHTAR et al, 1989; LINNEMEYER and HAMILTON, 1990; PARR et al, 1990; ZHENG et al, 1991b; CROY and KISO, 1993; LINNEMEYER and POLLACK, 1994).

A confirmação final de que as NKu pertencem à linhagem NK foi elegantemente demonstrada com animais transgênicos TgE26 (NK⁺, T⁻) e Rag-2^{-/-} (NK⁺, T⁻, B⁻) deficientes em linfócitos (GUIMOND et al, 1999; CROY et al, 2000a,b). Estes animais, quando transplantados com células de medula óssea ou baço de animais doadores depletados de linfócitos T e B (SCID ^{-/-}) foram capazes de reconstituir a população de células NK tanto circulantes quanto do útero na gestação (GUIMOND et al, 1998; CROY et al, 2000a, b).

As células NKu em camundongos estão presentes em proporções variadas no útero durante a gestação, ou em úteros virgens (STEWART and PEEL, 1980, 1981; KISO et al, 1992). KISO e colaboradores (1997), utilizando Ly49 e Asialo-GM-1, sugeriram que as formas precursoras de NKu poderiam ser residentes permanentes do útero, estando presentes a partir de 4 semanas. Há controvérsias sobre a sua incidência no útero virgem ou não prenhe em decorrência da ambiguidade dos marcadores utilizados para a identificação destas células, uma vez que não se tem conhecimento de um marcador específico das NKu, que identifique as formas precursoras ou menos diferenciadas. Por outro lado, PAFFARO JR (2000, comunicação pessoal), utilizando lectina *Dolichos biflorus*, que tem alta seletividade e afinidade pelas NKu de camundongos (CORRÊA DA SILVA, 1997), em estudos estereológicos e quantitativos, encontraram formas precursoras de NKu apenas a partir do 5º dia de gestação. Segundo GIACOBUCCI (1999, comunicação pessoal), no período de 36 horas pós-parto, não foram encontradas mais células NKu no ambiente uterino.

A presença de células NK ou similares a estas foi descrita em outros animais tais como: camundongo selvagem, rato, hamster, macaco, ovelha, veado e porco (STEWART, 1998).

Em humanos foi identificado, além das NK CD56^{bright}/CD16, um novo subgrupo de células linfocitárias denominadas NKT, que apresentam características de células NK, porém sofrem maturação no timo adquirindo alguns receptores de membrana típicos de linfócitos T (EMOTO et al, 2000). Elas compreendem uma população celular CD4⁺ e CD4⁻8⁻, expressando ambos TCR α/β e marcadores de células NK, como NKR-P1 (NK1) e Ly49 (BENDELAC et al, 1997). Esta subpopulação não é encontrada no útero de camundongos prenhes.

2.3- Características gerais das células Natural Killer uterinas (NKu)

À semelhança das células NK encontradas no sangue circulante (NKc), as NK do ambiente uterino (NKu) expressam marcadores de superfície, tais como asialo GM-1, NK1.1, Thy-1, CD45 (MUKHTAR et al, 1989; PARR et al, 1990), CD94/NKG2C (KING et al, 2000) receptor para interleucina-2 (IL-2R), receptor beta (MUKHTAR et al, 1989) e ainda receptores para interleucina 15 (IL-15R α) e para MHC classe I Ly49G2 (LGL-1).

As células NKu surgem no início da gestação e acumulam-se na região mesometrial do útero prenhe, além de serem encontradas no interior dos vasos endometriais e em meio às lacunas ocupadas por sangue materno da placenta, assim como são encontradas em íntima associação com células trofoblásticas (STEWART and PEEL, 1978; STEWART, 1984).

As células precursoras das NKu são pequenas, destituídas de grânulos (PEEL, 1989; CORRÊA DA SILVA, 1997; PAFFARO JR et al, 1999b), não podendo ser distinguidas dos linfócitos. À medida que se diferenciam, por volta do 6º ddg, tornam-se maiores, adquirem grânulos e são observadas figuras de mitose. Em roedores, a diferenciação das NKu envolve o acúmulo de glicogênio e o desenvolvimento de grânulos citoplasmáticos com elevação do conteúdo da perforina no seu interior (PARR et al, 1990), caracterizando células NKu maduras.

A proliferação das células NKu continua nos 10º-12º ddg, alcançando seu maior número entre os 12º e 14º ddg. A partir de então, ocorre a gradual diminuição destas células no útero (DELGADO et al 1996), desaparecendo completamente no período pós-parto (PEEL, 1989). As células NKu em roedores têm sua viabilidade comprometida a partir

da metade da gestação, exibindo marcadores associados à apoptose, apresentando fragmentação celular por perda da integridade da membrana e liberação dos grânulos no interior do estroma uterino (WHITELAW and CROY, 1996).

As células NKu plenamente diferenciadas são grandes, alcançando de 30 a 35µm de diâmetro, podendo chegar até 50µm (STEWART and PEEL, 1977). São caracterizadas ainda pelos grânulos citoplasmáticos contendo glicoproteínas reativas ao PAS (Ácido Periódico de Schiff), resistente à diastase (SMITH, 1966; LARKIN and FLICKINGER, 1969; PEEL et al, 1983; KISO et al, 1992).

No nível ultraestrutural, os grânulos citoplasmáticos das células NKu são heterogêneos (LARKIN and FLICKINGER, 1969, CORRÊA DA SILVA et al, 1996), organizados em um centro homogêneo margeado por um capuz eletrondenso de microvesículas membranosas (CORRÊA DA SILVA et al, 1996). Na região central homogênea dos grânulos das NKu está contida a perforina (ZHENG et al, 1991a) enquanto a serina esterase (PARR et al, 1990) e outras enzimas hidrolíticas, tais como a b-glucoronidase (BULMER, 1963), fosfatase ácida (BULMER, 1969), arilsulfatase e aminopeptidase (BULMER, 1968) e catepsinas D e B (CORRÊA DA SILVA, 1997) estão distribuídas na região do capuz eletrondenso. Tal distribuição constitutiva sugere que os grânulos apresentam compartimentos especializados, tendo um domínio lisossomal (capuz) e um domínio secretório (core) (JANIS et al, 1990, CORRÊA DA SILVA et al, 1996).

A perforina é uma proteína presente no conteúdo granular de linfócitos citolíticos (LIU et al, 1995), tanto de linfócitos T citotóxicos (PETERS et al, 1991) como em células NK (YOUNG and COHN, 1986). Essa proteína está associada à atividade lítica, perfurando a membrana da célula alvo, fazendo-a perder sua integridade (LIU et al, 1995).

Tanto os linfócitos T citotóxicos (LIN et al, 1991) quanto as NKu provocam a lise das células-alvo (HEBERMAN et al, 1986; MULLER et al, 1989; OJCIUS et al, 1991), utilizando os mesmos mecanismos, ou seja, perforina/granzima e Fas/FasL (NAGATA and GOSTEIN, 1995). O Fas ligante (FasL) é uma proteína trans-membrana que pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF), que, juntamente com outras proteínas granulares como hidrolases lisossomais, catepsina D e granzimas B estão armazenadas nos grânulos.

Estudos realizados *in vitro* com linfócitos deficientes em perforina mostraram uma redução na atividade lítica das células NKu (KAGI et al, 1994). Observações semelhantes foram realizadas por LIU et al (1995) em camundongos deficientes em perforina, mostrando serem incapazes de lisar fibroblastos. As granzimas são enzimas que podem

estar associadas ao desencadeamento da apoptose em células alvo, ou auxiliar outras proteínas como a perforina, e fragmentar o DNA da célula (NISHIMURA et al, 1988; GRIFFITHS and ARGON, 1995).

Pelas características morfológicas e pela imunofenotipagem não se pode distinguir as células NKc das NKu. Não se conhece até o momento qualquer marcador específico para a identificação das células NKu, contudo, tem sido relatado o uso de métodos citoquímicos com lectinas para a identificação das células NKu de camundongos. DAMJANOV and DAMJANOV (1992) relataram a lectina DBA como a única que reagia com as células NKu do endométrio prenhe de ratas e camundongos. Este dado foi confirmado por CORRÊA DA SILVA (1997) que distingue com o uso desta lectina em técnicas citoquímicas, 4 subtipos relacionados com os estágios de diferenciação das NKu de camundongos. Segundo CORRÊA DA SILVA (1997), a lectina DBA reage com glicoconjugados contendo N-acetil-galactosamina terminais, presentes na superfície celular e no conteúdo dos grânulos, padrão este não encontrado em qualquer outro tipo de linfócito de camundongos. PAFFARO JR e colaboradores (1999a), utilizando esta mesma lectina, quantificaram os subtipos de maturação das NKu presentes ao longo da gestação em camundongos.

2.4- Funções das células Natural Killer uterinas na interface materno-fetal

Frente às características fenotípicas e constitutivas, juntamente com a incidência específica no útero durante a prenhez, pressupõe-se uma importante participação das NKu na imunologia da reprodução (ZHENG et al, 1991b; ZHENG et al, 1993).

Tanto os linfócitos T citotóxicos (LIN et al, 1991) quanto as células NK provocam lise das células alvo (HEBERMAN et al, 1986; MULLER et al, 1989; OJCIUS et al, 1991), pela liberação do conteúdo citolítico dos seus grânulos. A citotoxicidade de NK e linfócitos T citotóxico é atribuída a um processo de secreção, no qual o conteúdo dos grânulos das células efetoras é liberado provavelmente por exocitose para o espaço extracelular entre estas células efetoras e a célula alvo (YOUNG and COHN, 1986, BOSSI and GRIFFITHS, 1999).

As presenças da perforina, serina esterases, hidrolases e outras enzimas degradativas nos grânulos das células NKu sugerem que podem desempenhar uma função lítica no ambiente uterino (KING et al, 1993).

WELSH E ENDERS, (1993), ao constatarem o aumento da quantidade de NK especificamente nos estágios iniciais da gestação, sugerem a participação destas células

na degradação das células epiteliais e do estroma adjacente durante a implantação embrionária e que, posteriormente, atuam sobre células endometriais, remodelando esta região na decidualização. Estas hipóteses não foram comprovadas experimentalmente, uma vez que animais transgênicos deficientes em células NK desenvolveram, normalmente, a implantação embrionária, assim como o início da decidualização (ASHKAR and CROY, 1999; CROY et al, 2000a, b; ASHKAR et al, 2000).

A incidência localizada das NKu na região mesometrial, junto ao endométrio basal limítrofe com o miométrio e a placenta fetal, fez pressupor a participação destas células na ruptura desta região por ocasião do parto (LARKIN, 1972; CROY, 1994; DELGADO et al, 1996; CROY et al, 1996-97). Depõe contra esta possibilidade a inexistência de experimentos comprobatórios, além de ser este período da gestação coincidente com o declínio acentuado de NKu (STEWART and PEEL, 1980; PEEL, 1989; PARR et al, 1990; KISO et al, 1992).

As potenciais células-alvos das NK são células infectadas por vírus ou tumorais, cujos receptores da classe MHC expressos na superfície sofrem alterações (LYUNGGREN and KARRE, 1990; GUMPERS and PARHAM, 1995; SU et al, 1998; COLONNA et al, 2000).

YOSHIZAWA e colaboradores (1994) demonstraram que a presença de microorganismos no útero não é essencial para o estabelecimento das células NKu, o que descarta a hipótese de que atuem somente na defesa, contra agentes infecciosos no útero. Da mesma forma, células-alvos infectadas por vírus ou animais prenhes infectados por vírus não alteram a incidência de células NK no útero, ou mesmo a resposta direta destas células (SÁNCHEZ et al, 1996; BUENDIÁ et al, 1998).

Experimentos realizados *in vitro* para avaliar a citotoxicidade das células NKu, frente às potenciais células-alvos tais como YAC-1 (CROY and KASSOUF, 1989; PARR et al, 1990; CROY et al, 1991a; LINNEMEYER and POLLACK, 1994; HEAD 1996-97) e 164 wehi (STEWART and PEEL, 1999a; STEWART and PEEL, 1999b) demonstraram pouca ou nenhuma atividade citolítica destas células.

Da mesma forma, estudos realizados em camundongos deficientes em perforina demonstraram que estes animais apresentavam normalidade na gestação, desenvolvimento da glândula metrial e diferenciação das células NKu, indicando que a perforina não é essencial para o sucesso da gestação (STALLMACH et al, 1995). Em decorrência destas frustrantes constatações quanto ao potencial citotóxico/citolítico das NK no ambiente uterino, as atenções foram focalizadas em outras possíveis atuações das NKu.

Além da produção de proteínas líticas, as células NKu (ZHENG et al, 1991a; PARR et al, 1995) produzem componentes da matriz extracelular, incluindo proteoglicanas e osteopontina (PARR et al, 1990; BRAGA and GENDLER, 1993; KISO et al, 1994; CROY, 1994; GUIMOND et al, 1999), fatores vasoativos, tais como o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) (PARR et al, 1990; GUIMOND et al, 1999, BURNETT and HUNT, 2000) e participam da produção de citocinas, tais como GM-CSF, CSF-1, fator inibidor de leucemia, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ (CUTURI et al, 1989; CROY et al, 1991b; GRAHAM et al, 1992; CHENG et al, 1993; DRAKE and HEAD, 1994; JOKHI et al, 1994; GRAY et al, 1994; WHITELAW and CROY, 1996; CROY et al, 1996-97; PLATT and HUNT, 1998; GUIMOND et al, 1999).

Os recentes desenvolvimentos de múltiplas linhagens de camundongos geneticamente modificados têm contribuído com importantes dados para inferir as possíveis funções para as células NK no útero. A análise do útero das linhagens de camundongos imunodeficientes TgE26, deficientes em células NK e T revelaram acentuadas anormalidades na gestação (GUIMOND et al, 1996, 1997; GUIMOND et al, 1999; ASHKAR et al, 2000). Nestes animais não ocorre o desenvolvimento da glândula metrial, mas sim, um edema decidual com defeito na remodelação vascular, envolvendo grandes artérias maternas, além da redução acentuada no tamanho da placenta e do feto e maior incidência de reabsorções dos sítios embrionários ou fetais (GUIMOND et al, 1997; ASHKAR et al, 2000).

Efeito semelhante foi observado em camundongos transgênicos deficientes no gene IFN- γ (CROY et al, 2000a), exceto pela formação da glândula metrial com presença das células NKu. Estes dados comprovaram que as células NKu são responsáveis pela produção de IFN- γ durante a gestação, com ativa participação na manutenção da viabilidade das células deciduais, na modificação dos vasos sanguíneos do útero, no desenvolvimento normal da placenta e do feto (ASHKAR and CROY, 1999; ASHKAR et al, 2000; REDLINE, 2000). Com a ausência desta citocina ocorre desenvolvimento menor dos grânulos das NKu e alterações ultraestruturais (BACH et al, 1997).

O processo de neovascularização no útero de roedores é maior após a implantação embrionária, acentuando-se com a decidualização (WELSH and ENDERS, 1991). Segundo os experimentos de KLAUBER e colaboradores (1997), em camundongos tratados com um inibidor da angiogênese, a implantação ocorre normalmente, entretanto por volta do 9º ddg, ocorre fracasso na prenhez. Estes dados demonstram a importância da vascularização e indicam o período crítico deste evento. WANG e colaboradores (2000) demonstraram

reação positiva para o fator de crescimento endotelial (VEGF) nos grânulos das NKu, mostrando que estas células são a maior fonte de expressão VEGF.

GUIMOND et al (1997) mostraram que o óxido nítrico (NO) derivado das células NKu também é importante no desenvolvimento da vascularização uterina materna durante a gestação. Mais recentemente, em camundongos deficientes em iNOS, foram observadas anormalidades semelhantes nos vasos, ou seja, junto à musculatura circular, sugerindo a idéia de que a produção de NO pelas células NKu estaria relacionada com o relaxamento das artérias espiraladas uterinas (BURNETT and HUNT, 2000).

Enquanto os estudos recentes relacionam a importância das citocinas produzidas pelas células NKu na manutenção da homeostasia da gestação, permanece a incógnita sobre as possíveis funções imunológicas destas células que afluem para o ambiente uterino exclusivamente durante a gestação.

STEWART (1984) que constatou a presença de células NK junto ao labirintotrofoblasto da placenta de camundongos, sugerindo ser este o mecanismo para a remoção de trofoblastos aberrantes, os quais poderiam causar disfunção e malformação na placenta (HEAD, 1996-97). A partir destes dados, vários ensaios têm sido realizados para comprovar esta atividade.

Os experimentos *in vitro* realizados por CROY and KISO (1993) demonstraram que as células NKu são capazes de lisar um pequeno número de células trofoblásticas em cultura. Da mesma forma STEWART and MUKHTAR (1994) demonstram em microscopia eletrônica de varredura que as células NKu obtidas do explante da glândula metrial podem estar em íntimo contato com células trofoblásticas.

As possíveis interações entre a célula NKu e o trofoblasto têm sido parcialmente esclarecidas com os avanços nos conhecimentos sobre os receptores inibidores (KIR) e ativadores (KAR) da função citotóxica das células citolíticas.

As células NK apresentam receptores de membrana que reconhecem os antígenos MHC classe I, dos subtipos HLA-E, HLA-G e HLA-C (KING et al, 2000; LOKE and KING, 2000), enquanto os linfócitos T citotóxicos (CTL) reconhecem HLA-A (ARCK et al, 1999). As células trofoblásticas não expressam, na sua superfície, o HLA-A (AVRIL et al, 1999), o que explica a ausência ou a migração expressiva de linfócitos T no ambiente uterino durante a gestação. Por outro lado, os trofoblastos expressam o HLA-E e HLA-G, que são reconhecidos pelos receptores Ly49G das NK. Contudo, o receptor Ly49G em camundongos (YOKOYAMA, 1993), e CD94/NKG2 (LOKE and KING, 2000) em humanos, é um receptor KIR que inibe a indução da atividade lítica das NK (GUMPERZ and

PARHAM, 1995; MORETTA and MORETTA, 1997; VERMA et al, 1997). Este reconhecimento entre as NK e o trofoblasto é de extrema importância para o sucesso da gestação (LOKE and KING, 2000; KING et al, 2000), imaginando a situação contrária, onde todos os embriões heterozigotos com a expressão do gene paterno seriam, de imediato, alvo da ação citolítica das NKu. Neste último contexto, é importante ressaltar os dados recentes de MULLER et al (1999), os quais demonstraram a prolactina-like proteína A (PRL-A) como uma via de sinalização entre células trofoblásticas e células NKu, expressada na superfície das células trofoblásticas, sugerindo a essa molécula a função de inibir a atividade citolítica das células NKu.

Os dados recentes explicam tanto o insucesso dos ensaios realizados anteriormente sobre a avaliação da citotoxicidade das NKu frente às células trofoblásticas, quanto à complexidade dos mecanismos envolvidos no equilíbrio da interface materno-fetal. Neste equilíbrio ainda deve ser computada a comunicação do reconhecimento do embrião/feto com o organismo materno, mediado pelo trofoblasto/placenta.

Embora haja sugestões de que a restrição da invasão do trofoblasto possa ocorrer por outros mecanismos que não o citotóxico de contato direto (KING et al, 1996-97), ainda não existe nenhuma evidência experimental.

Por conseguinte, não há dados que justifiquem satisfatoriamente a presença de uma célula imunologicamente competente com o seu potencial e arsenal citolítico mantido latente no ambiente uterino durante a gestação.

Considerando-se que a maioria dos estudos tenha sido realizada, até então, em ambientes uterinos da gestação normal, torna-se impossível aferir todo o potencial das células NKu. Assim, para se avaliar a real potencialidade das células NK na gestação é necessário estabelecer modelos experimentais alternativos que induzam a estados de anormalidades ou desequilíbrios na interação materno-embriônica. Presume-se ainda que pelas variações na incidência e distribuição das NK no ambiente uterino, no decorrer da gestação, as respostas destas células possam ser diferentes.

3-OBJETIVOS

3.1- Objetivo primário:

- Estabelecer um modelo experimental para estudo do comportamento das células NKu em situação de desequilíbrio ou anormalidade na gestação.

3.2- Objetivos parciais:

- Provocar a lesão embrionária ou fetal nos diferentes períodos da gestação de camundongos para avaliar os efeitos no ambiente uterino e nas células NKu.

- Analisar e classificar macroscopicamente os efeitos da lesão embrionária/fetal após 6 e 24 horas, nos cornos uterinos de 6º, 8º, 10º, 12º, 15º e 17º dia de gestação.

- Avaliar e classificar as alterações das células NKu em microscopia fotônica, por meio de métodos citoquímicos de PAS e lectina DBA.

- Estabelecer uma análise correlativa dos dados macroscópicos e microscópicos no modelo de estudo proposto.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Obtenção de animais em período de gestação conhecida

Foram utilizados camundongos da linhagem SWISS, procedentes do CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura e iluminação controladas, com acesso à água e alimentação *ad libitum*. Fêmeas virgens com 12 a 16 semanas de idade foram acasaladas com machos da mesma linhagem e a manhã em que foi constatada a presença da rolha vaginal foi considerado o 1º dia da gestação (ddg).

4.2- Indução da lesão embrionária

As fêmeas prenhes dos 6º, 8º, 10º, 12º, 15º e 17ºddg, totalizando 36 animais, foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de Virbaxyl 2% (Virbac) e Francotar (Virbac), imobilizados na posição decúbito dorsal e, em seguida, laparotomizadas em condições assépticas. Após a constatação da normalidade dos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal, ao longo de ambos os cornos uterinos, foi prosseguido o procedimento cirúrgico da lesão mecânica, constantemente nos 2º e 4º sítios proximais ao ovário do corno uterino esquerdo. A lesão consistiu na perfuração da parede uterina através da face antimesometrial, atingindo o embrião o feto por meio de uma agulha hipodérmica (12x7mm). A profundidade da agulha hipodérmica introduzida nos sítios variaram de 2 a 7mm, de acordo com o dia de gestação utilizado. Este procedimento visou atingir o embrião ou o feto, sem lesar a região mesometrial onde se localiza o acúmulo de células NKu. Após o procedimento, as incisões da túnica muscular e da pele da parede abdominal foram devidamente suturadas.

Como controle foram usados animais submetidos à laparotomia e os cornos uterinos manipulados igualmente, porém sem a indução da lesão nos sítios. Os animais que apresentaram quaisquer anormalidades nos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal (hemorragias ou sinais de degeneração), não foram utilizados no experimento.

4.3- Coleta e processamento do material

Nos períodos de 6 e 24 horas pós-lesão, os animais foram novamente anestesiados, laparatomizados e após a análise macroscópica foram perfundidos com solução fixadora via ventrículo esquerdo.

4.4- Análise macroscópica

Em cada um dos animais foram contabilizados os números totais de sítios de desenvolvimento embrionário/fetal do corno uterino esquerdo e do corno uterino direito e, avaliados quanto à presença de áreas com hemorragia, bem como a intensidade da hemorragia presente.

Os dados foram agrupados para se obter um índice relativo dos diferentes aspectos encontrados nos períodos de 6 e 24 horas pós-lesão de cada um dos dias de gestação analisados.

4.5- Processamento para Microscopia Fotônica (MF)

4.5.1- Processamento histológico

Após a análise macroscópica foi realizada a toracotomia dos animais para exposição do coração, através do qual foi perfundida a solução fixadora composta por paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por um período de 15 minutos em um volume aproximado de 30ml para cada animal.

Após a perfusão, foram retirados ambos os cornos uterinos e cada sítio de desenvolvimento embrionário ou fetal foi separado, de acordo com a classificação macroscópica. Em seguida, os sítios de interesse foram seccionados transversalmente na região mediana e estes, mantidos imersos por um período adicional de 2 horas na solução fixadora. Os sítios classificados e clivados foram acondicionados em diferentes frascos, de maneira que em cada frasco continha ambas as metades de um mesmo sítio.

Os materiais fixados foram processados de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina (Histosec Merck).

4.5.2- Reações citoquímicas

Os cortes em parafina de 5µm de espessura foram coletados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina e desparafinizados para serem submetidos às reações de citoquímica de PAS (Ácido Periódico-Schiff) e lectina DBA (*Dolichos biflorus* - Sigma Chem. Co, USA).

4.5.2.1- Reação de PAS (Acido Periódico - Schiff)

- tratamento com a amilase (diastase) 1% em água destilada durante 1 hora, a 37°C
- lavagem em água destilada

- tratamento com ácido periódico 0,5% durante 10 minutos
- lavagem em água destilada
- tratamento com reativo de Schiff durante 9 minutos
- lavagem em água destilada
- tratamento com bissulfito de sódio 0,5%, 3 banhos de 3 minutos
- lavagem em água destilada
- contracoloração com hematoxilina de Harris
- tratamento com solução aquosa saturada de carbonato de lítio

Os cortes foram então desidratados e montados entre lamínulas com resina Entellan. As observações foram realizadas em microscópio de luz Eclipse 800 (Nikon).

4.5.2.2- Reação citoquímica com a lectina DBA (*Dolichos biflorus*)

- lavagem com tampão fosfato-salina (PBS) 0,05M pH 7,4
- bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (Merck/Brasil) 0,3% em PBS 0,05M pH 7,4
- lavagem em PBS 0,05M pH 6,8
- bloqueio com BSA (Albumina Sérica Bovina – Sigma Chemical,USA) 1% em PBS 0,1M pH 6,8
- tratamento com lectina DBA (*Dolichos biflorus* agglutín) (Honen Chemical Co; Japão) biotinada em PBS/BSA (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 1% pH 6,8, diluída a 1:300, a 4°C, em câmara úmida, por 12 a 14 horas (over-night)
- lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 por 3 vezes
- tratamento com complexo estreptovidina peroxidase (Dako Corporation, EUA) na proporção 1:300, durante 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente
- lavagem com PBS 0,05M pH 7,4
- lavagem com Tris-HCl 0,05M pH 7,4
- revelação com diaminobenzidina (0,5mg/ml) (Sigma, St. Chemical Co, Louis/USA), peróxido de hidrogênio 0,3% em Tris-HCl 0,1M pH 7,4, acompanhando-se a reação ao microscópio fotônico
- lavagem em água destilada
- contracoloração com hematoxilina de Harris durante 15 segundos
- tratamento com solução aquosa saturada de carbonato de lítio durante 15 segundos

Em seguida, os cortes foram desidratados e montados permanentemente com resina Entellan (Merck).

Para as reações-controles foram feitos exatamente os mesmos procedimentos, excetuando-se a adição de lectina DBA na etapa de incubação, ou adicionando-se o açúcar inibidor N-acetil-galactosamina 0,1M (Sigma, Chemical Co, St Louis/USA) à solução de lectina DBA.

As observações foram realizadas em microscopia de luz convencional ou de contraste de interferência diferencial (Nomarsky)- Nikon Eclipse 800.

4.5.3- Método para detecção de núcleo apoptótico

Foi utilizado o Kit TdT-FragEI (Oncogene) em cortes histológicos dos úteros prenhes de animais experimentais lesados dos 8º, 10º, 12º, 15º e 17º ddg em 6 e 24 horas após a lesão embrionária para detecção de DNA fragmentado, conforme procedimento recomendado pelo fabricante, com as modificações introduzidas no laboratório e transcrito as abaixo:

- Lavagem em tampão tris-salina (TBS) 0,05 M
- Tratamento com proteinase K 1:100 em tampão Tris pH 7,4 0,01 M
- Lavagem em TBS 0,05 M
- Tratamento com DNase I, apenas nas reações controles positivas
- Lavagem em TBS 0,05 M
- Incubação com tampão de equilíbrio 1:5 em H₂O destilada
- Incubação com solução reagente Tdt (Tdt biotinada)- 12 horas a 4°C
- Lavagem em TBS 0,05 M
- Incubação com solução de interrupção
- Lavagem em TBS 0,05 M
- Lavagem em PBS 0,05M
- Incubação com tampão-bloqueio
- Incubação com estreptoavidina fluoreceína, 1:500 em PBS/BSA1% + lectina DBA- conjugada com rodamina (Vector, USA) a 1:50
- Montagem com Vectashield (Vector)

As observações foram realizadas no Microscópio Nikon, Eclipse 800, com sistema de epifluorescência acoplada com filtro duplo (filtro de barreira B2H/G2A).

5- RESULTADOS

5.1- Análise macroscópica dos sítios de implantação

Na análise macroscópica, os cornos uterinos e os seus sítios de desenvolvimento embrionário/fetal dos animais controles apresentaram os aspectos próprios que acompanham a evolução da gestação sem anomalias aparentes (FIGS. 1A e B).

Nos cornos uterinos dos animais experimentais foram encontradas, com frequência, áreas hemorrágicas de diferentes intensidades junto aos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal (FIGS.1C-F). Estas hemorragias foram constatadas não apenas nos sítios que foram submetidos à lesão embrionária, mas também em outros sítios. Devido à frequência e constância com que alguns padrões de hemorragia eram encontrados nos períodos de gestação e pós-lesão analisados, foram classificados em quatro padrões distintos como segue:

- HL (hemorragia lateral): sítios que apresentaram pontos hemorrágicos pequenos e pouco intensos junto às constrições laterais que davam continuidade aos segmentos de interimplantação dos cornos uterinos (FIG.1C).

- HM (hemorragia na região mesometrial): sítios com hemorragia localizada na região mesometrial (6° ao 10°ddg) (FIGS.1D, F) ou junto à placenta (após 12° ddg).

- HG (hemorragia generalizada): sítios com hemorragia acentuada que ocuparam não apenas a região mesometrial, mas também o restante do sítio de implantação (FIGS.1E, F).

- HA (hemorragia com atrofia): sítios com hemorragia generalizada acompanhada da redução significativa na dimensão dos sítios.

Ao lado dos padrões acima referidos, os sítios de implantação dos animais experimentais que apresentaram aspecto normal, à semelhança dos sítios dos animais controles, sem qualquer sinal aparente de hemorragia foram identificados como padrão N (normal) (FIG.1E).

5.1.1- Incidência dos diferentes padrões de resposta hemorrágica nos sítios embrionários ao longo da gestação

Os vários sítios de desenvolvimento embrionário/fetal presentes nos cornos direito e esquerdo apresentaram variações nas respostas, estando presentes tanto sítios aparentemente normais quanto com diferentes padrões hemorrágicos nos períodos de 6 e 24 horas pós-lesão.

As incidências destes diferentes padrões de resposta hemorrágica, foram avaliadas em cada um dos grupos de animais experimentais como descrito a seguir e tabuladas nas tabelas 1 e 2, para avaliar a incidência nos diferentes períodos gestacionais.

6° ddg

Em 6 horas pós-lesão, apenas os sítios lesados do corno esquerdo apresentaram resposta padrão HG, enquanto no restante dos sítios, tanto do corno esquerdo quanto do direito predominaram as HL (42%; 58% respectivamente).

Após 24 horas da lesão, os sítios do corno esquerdo apresentaram incidência moderada de hemorragia generalizada (16%) e elevada de hemorragia lateral (48%). Os sítios lesados apresentaram padrões HG e HL. No corno direito foi constatada a presença de resposta padrão HM (21%) e HL (21%) nos sítios de implantação, porém, com predominância de sítios de aspecto normal (58%).

8° ddg

Em 6 horas pós-lesão, foi verificada, no corno esquerdo, a alta incidência da resposta padrão HM (45%) e HG (35%). Os sítios lesados apresentaram padrão HM ou HG. No corno direito, foram verificados sítios com resposta padrão HM (35%), porém 30% apresentaram HL e 35% de aspecto normal.

Após 24 horas da lesão, no corno esquerdo houve igual incidência entre os padrões HL (30%), HM (30%) e HG (30%). Os sítios lesados apresentaram padrão HL ou HG. No corno direito, constatou-se predomínio de sítios com resposta padrão HL (48%) ao lado dos padrões HG (26%) e HM (18%).

10° ddg

Em 6 horas pós-lesão, os sítios do corno esquerdo apresentaram predominância de resposta padrão HG (47%), sendo todos os lesados incluídos nesta categoria, enquanto o padrão HM era elevado no corno direito (40%). As incidências de padrão normais foram reduzidas ou totalmente ausentes no corno direito.

Após 24 horas da lesão, nenhum sítio do corno esquerdo apresentou aspecto normal, havendo predominância de HG (38%) entre os sítios lesados. Os sítios lesados também apresentaram padrão HA (18%). No corno direito houve predominância de HM (43%).

12° ddg

Em 6 horas pós-lesão, verificou-se a alta incidência de HA (31%) no corno esquerdo, enquanto no corno direito predominaram os padrões HM (27%) e HG (20%). Os sítios lesados apresentaram todos os padrões de hemorragia, com predominância de HA (31%).

Após 24 horas da lesão, houve predominância da resposta padrão HA (39%), sendo os sítios lesados encontrados entre HM, HG e HA. No corno esquerdo ainda foram constatados sítios com aspecto normal, mas estes foram observados em grande proporção no corno direito (56%), embora ocorresse incidência significativa da HA (32%).

15° ddg

Em 6 horas pós-lesão, os sítios do corno esquerdo apresentaram predominantemente resposta do padrão HG (42%) no qual estavam incluídos todos os sítios lesados. No corno direito, a maioria apresentou aspecto normal (60%), porém, o padrão do tipo HM esteve presente em 35% dos sítios.

Após 24 horas da lesão, os sítios do lado esquerdo apresentaram resposta padrão HM (22%), HG (36%) ou HA (14%), estando os sítios lesados distribuídos entre estas categorias. No corno direito, os sítios apresentaram respostas padrões HM (35%), HL (30%) ou normais (35%).

17° ddg

Em 6 horas pós-lesão, os sítios do corno esquerdo apresentaram resposta padrão HM (23%) HG (23%) ou HA (12%), sendo os lesados encontrados entre HG e HA. No corno direito foram encontrados sítios com hemorragia mesometrial (26%) e hemorragia lateral (37%), ao lado de sítios normais (37%).

Após 24 horas, no corno esquerdo, os sítios lesados foram encontrados com hemorragia generalizada (33%) ou atrófica (5%). O restante dos sítios apresentou padrão HM (12%) ou normal (50%). No corno direito, a grande maioria era normal (66%), com alguns HM e HA.

5.2- Análise em Microscopia Fotônica (MF)

5.2.1- Sítios de implantação em camundongos

Cada sítio de desenvolvimento embrionário ou fetal no útero de camundongos pode ser subdividido em duas metades: a antimesometrial e mesometrial, cujas dimensões e

limites modificaram-se com o desenvolvimento do período da gestação (FIGS.2A, B, C). Na região antimesometrial encontrou-se o embrião ou feto em desenvolvimento enquanto na mesometrial foi o local onde se desenvolveu a placenta e onde havia ocorrência das células NKu. Do 6° ao 10°ddg, estas regiões estavam bem definidas, sendo a área próxima ao embrião ocupada pelo estroma endometrial decidualizado e a área próxima ao miométrio pelo estroma não decidualizado (FIG.3A). Na segunda metade da gestação (12°ddg), o endométrio desta região tornou-se gradualmente mais delgado, sendo ocupado pela placenta fetal em desenvolvimento, enquanto o feto ocupou a maior parte da região antimesometrial (FIG.3B).

No presente estudo, a região mesometrial nos diferentes períodos de gestação foi subdividida em 3 grandes áreas (FIG.2) para melhor avaliação dos fenômenos que ocorreram após a lesão, quais sejam: R1- a área do endométrio proximal em relação ao cone ectoplacentário ou à placenta em desenvolvimento; R2, a área intermediária que engloba o endométrio decidualizado e/ou não decidualizado, até o limite do miométrio e por último, R3, área do miométrio juntamente com a glândula metrial (FIG.2).

5.2.2- Identificação das células NKu pelo PAS e Lectina DBA

5.2.2.1- Animais controles

A partir do 8°ddg e estendendo-se ao 17°ddg de animais controle foi possível identificar células NKu pela citoquímica de PAS, devido à sua forma usualmente arredondada ou ovóide, núcleo esférico e central ou ligeiramente deslocado para a periferia da célula, com nucléolo evidente e os seus grânulos citoplasmáticos PAS positivos amilase resistentes (FIG.3C). Ao lado das formas repletas de grânulos PAS positivos, foram encontradas células menores com menor quantidade de grânulos PAS positivos. Da mesma forma, a citoquímica com a lectina DBA mostrou a presença das células NKu distribuídas na região mesometrial em todo o período analisado (FIGS.3D, E, F). Esta técnica demonstrou ser altamente seletiva para as células NKu presentes no endométrio de camundongos, não marcando outras células, exceto algumas células endoteliais de vasos presentes no miométrio e perimétrio.

De acordo com o padrão de marcação na superfície celular e do conteúdo citoplasmático foram identificados 4 subtipos de NKu reativo à lectina DBA, quais sejam:

- O subtipo 1, células pequenas, sem grânulos citoplasmáticos DBA positivos, porém apresentaram reatividade em sua superfície celular (FIG.3D).

- O **subtipo 2**, células pequenas com poucos grânulos reativos à lectina DBA, além de marcação positiva na superfície celular (**FIG.3D**).
- O **subtipo 3**, células maiores, repletas de grânulos DBA positivos e superfície celular marcada (**FIG.3E**).
- O **subtipo 4**, células que exibem reação positiva para lectina DBA em sua superfície e nos grânulos citoplasmáticos, porém com áreas de extração citoplasmáticas acentuadas (**FIG.3F**).

Todos estes subtipos de NKu foram observados em nossas amostras controle nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal, a partir do 8º ddg, estendendo-se ao 12º ddg (**Tabela 3**). No 6º ddg foram encontrados somente os subtipos 1 e 2 enquanto, a partir do 12º e, estendendo-se aos 15º e 17º ddg foi notado o predomínio de células com extensas áreas de extração citoplasmática correspondentes ao subtipo 4 de células NKu. As distribuições e as incidências destes subtipos de NKu ao longo da gestação, estão demonstradas na tabela 3.

A técnica de PAS identifica apenas os subtipos 2, 3 e 4, coincidindo com aqueles que apresentam o conteúdo maior de grânulos PAS positivos (**FIG.3C**). Como a técnica de PAS não permite a identificação do subtipo 1, as descrições subseqüentes serão baseadas nos resultados obtidos com a citoquímica de lectina DBA.

5.2.2.2- Animais experimentais

Nas análises realizadas em materiais procedentes de animais experimentais (6 e 24 horas pós-lesão), obtidos nos diferentes períodos da gestação foram constatados, pela reação citoquímica com lectina DBA, além dos subtipos de células NKu normais, outros que apresentaram padrões distintos de marcação não encontrados em animais controles. Frente a esta análise preliminar, as alterações constatadas com maior freqüência e constância nas NKu, ao longo do período analisado, foram classificadas pelas observações em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (**FIG.4**).

Alteração classe I-Células NKu aparentemente integras com marcação positiva pela lectina DBA na superfície celular, porém fracas ou totalmente ausentes nos grânulos (**FIG.4A**).

Alteração classe II-Células NKu com marcação positiva na superfície celular, com presença de grânulos grandes com a região periférica fortemente marcada e o interior pouco ou não-reativo (**FIG.4B**).

Alteração classe III-Células NKu apresentando a superfície celular positiva e os grânulos parcialmente reativos à lectina DBA (FIG.4C).

Alteração classe IV-Células NKu aparentemente íntegras, sem marcação na superfície celular, porém apresentando grânulos com conteúdo DBA intensamente positivo (FIG.4D).

Alteração classe V-Células NKu aparentemente íntegras com marcação descontínua na superfície celular e apresentando grânulos DBA positivos e negativos lado a lado (FIG.4E).

Alteração classe VI-Células NKu fragmentadas apresentando marcação positiva na superfície dos fragmentos citoplasmáticos (FIG.4F).

5.3- Análises das incidências de células NKu nos sítios lesados

As análises realizadas em materiais procedentes de animais experimentais não se restringiram somente aos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal submetidos à lesão embrionária, mas também foram realizadas nos sítios não lesados, que apresentaram hemorragias tanto no corno homolateral quanto contralateral.

Os sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal que tiveram o mesmo padrão de resposta hemorrágica em dado período da gestação, independente de serem ou não do mesmo corno uterino, apresentaram as mesmas classes de alterações nas células NKu.

Nos sítios normais (não hemorrágicos) e nos sítios com hemorragia lateral (HL), as células NKu apresentaram pela lectina DBA distribuição e aspecto normal à semelhança das NKu encontradas nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal de animais controles. Nos demais padrões de hemorragia, as células NKu presentes apresentaram alterações, cujas incidências nos diferentes períodos de gestação e localizações estão apresentadas na **tabela 4**.

6° ddg

Controles

A luz do útero apresentava-se evidente com a presença do blastocisto na região da cripta. As glândulas uterinas estavam presentes e confinadas à região profunda do endométrio, próxima ao miométrio. O estroma endometrial na porção antimesometrial apresentava reação decidual ao redor do embrião recém-implantado na cripta uterina.

Nas R2 e 3, foram identificadas raras células NKu dos subtipos 1 e 2. No estroma decidualizado da região antimesometrial não foram identificadas NKu.

A região do estroma não decidualizado apresentava células do tipo fibroblastos alongados, com grandes espaços extracelulares, constituídos de matriz de tecido conjuntivo frouxo.

6 horas pós-lesão

O sítio lesado com padrão de resposta HG apresentou, na área do endométrio mesometrial próximo ao embrião (R1 e 2), áreas de extravasamento sanguíneo. Os vasos sanguíneos estavam dilatados. Também foi observada, na área decidualizada da região mesometrial para a antimesometrial, a degeneração do epitélio luminal. Poucas células NKu foram encontradas distribuídas nas R1 e 2, caracterizadas como subtipos 1 e 2 normais, sem alteração.

Os sítios de implantação lesados que tiveram padrão de resposta HL apresentaram distribuição das células NKu de subtipos 1 e 2 normais, não sendo encontradas células NKu com alteração.

24 horas pós-lesão

Neste período verificou-se um aumento substancial de células NKu distribuídas na região mesometrial, decorrente do próprio avanço da gestação, correspondendo ao 7º ddg.

Os sítios lesados apresentaram padrão HG, onde foram encontradas células NKu de subtipos 1 e 2, na R 1 e 2, além de raras células NKu de subtipo 3. Na R 1 e 2, as células NKu apresentaram alteração da classe II. Porém ainda foram observadas células de subtipos 1, 2 e 3, além de raras células de subtipo 4 nesta área.

Nos sítios com padrão HL, as células NKu encontradas eram de subtipos 1 e 2, nas R 1, 2 e 3, não sendo observadas células com alteração nestas regiões.

Nos sítios que não foram lesados mas apresentaram HM, as células NKu presentes nas R 1 e 2, apresentaram alteração da classe II junto com células normais de subtipos 1, 2 e 3.

8º ddg

Controles

O endométrio da região mesometrial logo abaixo do miométrio apresentava ainda uma espessa camada de estroma não decidualizado, que dava continuidade ao endométrio

decidualizado, entremeada por vasos sanguíneos dilatados. Este endométrio decidualizado da região mesometrial, juntamente com o da região antimesometrial circunscreve totalmente o embrião em desenvolvimento. Na região mesometrial foi constatado um aumento significativo de células NKu em relação ao período anterior, sendo as de subtipos 3 e 4 distribuídos na R1, enquanto as de subtipos 1, 2 e 3 encontraram-se nas R 2 e 3. Foram observadas células NKu de subtipo 3 presente no interior dos vasos sanguíneos da região mesometrial.

6 horas pós-lesão

Os sítios lesados apresentaram padrões de resposta HM e HG. Na resposta HG, o embrião apresentou sinais de degeneração com infiltrado de células sanguíneas. No sítio com HM, as células NKu presentes na R1 eram, na sua grande maioria, de subtipos 3 e 4. O restante das células apresentou alteração da classe II.

Na R2, as células presentes eram normais de subtipos 2 e 3, com alteração da classe II, enquanto na R3, as células NKu presentes eram todas normais de subtipos 1 e 2.

As CTGs, tanto da região do cone ectoplacentário quanto da região mural do embrião apresentaram aspecto normal, embora fosse encontrada grande quantidade de hemáceas extravasadas ao seu redor. Junto às CTGs do cone ectoplacentário foram encontradas células NKu de subtipo 4.

O sítio lesado com HG apresentou nas R 1 e 2, predomínio de células NKu com alteração da classe II, como também células normais de subtipos 2, 3 e 4. Na R3, as células encontradas eram de subtipos 1 e 2.

24 horas pós-lesão

No sítio lesado com HG foram encontradas extensas áreas de extravasamento sanguíneo, junto ao embrião degeneração (FIGS.5A, B). Na R1, foram encontradas células NKu, com alteração classes IV e V, ao lado de células com padrão normal de marcação de subtipos 3 e 4. Na R2, além de NKu com alteração classe IV, foram encontradas células com alteração classe V, ao lado de células NKu normais de subtipos 2 e 3 em grande número. Na R3, as células NKu presentes eram de subtipos 1 e 2, não sendo encontradas formas alteradas.

Nos sítios que não foram lesados, mas que apresentaram resposta HM, as células NKu nas R 1 e 2, mostraram alterações de classes II e V e células normais de subtipos 3 e

4. Na R2, continuaram a ser encontradas células NKu com alteração das classes II e V com predominância desta última, além de células subtipos 2 e 3. Somente na R3, não foram encontradas alterações nas NKu, sendo observados os subtipos 1 e 2 normais.

Nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal com HL foram observadas células normais de subtipos 2, 3 e 4, na R1. Nas R 2 e 3 foram encontradas somente células normais de subtipos 1 e 2.

10º ddg

Controles

Com o desenvolvimento embrionário ocorre concomitantemente o aumento no volume total do útero, onde na região mesometrial, as células decidualizadas formaram traves espessas delimitando vasos sanguíneos dilatados.

As NKu apresentaram-se distribuídas pela porção decidualizada e não decidualizada do endométrio mesometrial, concentrando-se na porção mediana acima do botão placentário em formação. Na R3, foram encontradas NKu de subtipos 1, 2 e 3, enquanto nas R 1 e 2 eram de subtipos 3 e 4. Com frequência foram encontradas células NKu presentes na luz dos vasos sanguíneos e/ou inseridas nas suas paredes.

Neste período, o cone ectoplacentário expande-se lateralmente esboçando o contorno do futuro botão placentário. No perímetro desta massa celular trofoblástica verificam-se as células trofoblásticas gigantes (CTGs), delimitando a interface com a decídua (FIG.5C). As células NKu de subtipos 3 e 4 foram encontradas próximas às CTGs.

6 horas pós-lesão

Os sítios lesados apresentaram padrão HG. Os embriões apresentaram sinais de degeneração com infiltrado de células sanguíneas no espaço do saco vitelínico. As NKu encontradas próximas às CTGs e algumas poucas encontradas junto ao infiltrado no embrião apresentaram alteração classe III, próximas às CTGs, algumas delas aparentando sinais de degeneração (FIG.5D).

Na R1, foram encontradas células NKu com alteração classes III, IV e V, com predominância da primeira, juntamente com células normais de subtipos 3 e 4. Na R2 foi observado o predomínio de células com alteração classe IV ao lado de algumas células com alteração classe I e normais de subtipos 3 e 4.

Na R3, foram encontradas células com alteração classe IV e elevado número de células com alteração classe III, junto com células normais de subtipos 1, 2 e 3.

Os sítios não lesados com HM, tanto do como homolateral, quanto do contralateral apresentaram os mesmos padrões de respostas. Na R1, as células NKu apresentaram alterações de classes II e V, juntamente com células normais de subtipos 3 e 4.

Na R2, as células NKu presentes eram de subtipos 3 e 4 e a alteração encontrada, de classe II. Na R3 foram encontrados os subtipos normais 1, 2 e 3, não sendo observadas células com alteração.

24 horas pós-lesão

Neste período pós-lesão foram encontradas, nos sítios lesados, as respostas HG, HA e alguns sítios não lesados com HM. Na HG, foi observado na R1 células NKu com alterações classes IV e V, havendo predominância do primeiro junto às CTGs em degeneração.

Ainda na R2, foram encontradas células com alterações classes III, V e alta incidência de células com alteração classe IV. Nesta área, foram encontradas algumas células normais de subtipos 4. Na R3, as células NKu apresentaram as mesmas alterações da região anterior e predominância ainda da alteração classe IV, além de células de subtipos 3.

Nos sítios lesados com HA, na R1, as células NKu apresentaram alteração classe IV ao lado de células normais de subtipo 4. As células NKu localizadas na R2 apresentaram alteração da classe IV, ao lado de células normais de subtipo 4. Na R3, as células NKu apresentaram somente alteração da classe IV, ao lado de células normais subtipo 3.

Nos sítios não lesados com HM, as células NKu da R1 mostraram alterações, com predomínio da classe V ao lado da classe IV. Foram observadas, ainda, células normais de subtipos 3 e 4. Na R2, as alterações freqüentes foram das classes III e V, além de células de subtipo 4 normais. No entanto, as células da R3 apresentaram alteração das classes IV e V, com predominância desta última e células de subtipo 3.

12º ddg

Controles

Neste estágio, a placenta fetal já se organizava na sua forma discóide típica e todas as camadas trofoblásticas da porção fetal já puderam ser identificadas. Na porção lateral da placenta, as CTGs tornam-se mais alongadas, porém ainda projetavam seus prolongamentos entre as células decíduais e em direção aos vasos sanguíneos maternos.

Nas R 2 e 3, verificou-se NKu de subtipo 3 e 4 e uma maior proporção de subtipo 4, em relação aos períodos anteriores. Na R1, foram observadas células NKu de subtipo 3 e 4 e maior frequência de células de subtipo 4, principalmente próximo à interface placentária. Células de subtipo 3 presentes na luz dos vasos e/ou inseridas nas suas paredes, tornaram-se mais frequentes.

6 horas pós-lesão

Nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal com HA foi observada redução do volume do sítio de desenvolvimento embrionário/fetal como um todo onde as camadas de células trofoblásticas da placenta perderam a sua estratificação característica, com nítida desorganização da massa celular fetal (FIG.5A). As células NKu da R1, apresentaram alterações de classes III, IV e V, ao lado de células de subtipos 3 e 4. Nas R 2 e 3, as células NKu encontradas eram normais de subtipos 3 e 4, ao lado de células predominantemente com alteração da classe III.

No sítio lesado com HG, a R1 apresentou incidência moderada de células NKu com alteração classe IV e elevada de classe V e VI, ao lado de algumas poucas células normais correspondentes aos subtipos 3 e 4. Na R2 foram encontradas raras células NKu com alteração classe IV e incidência maior da classe V, ao lado de células normais de subtipo 4. Nas R 2 e 3, verificou-se em meio às células de subtipo 3 incidência rara de células com alteração classe I e maior de classe V.

Nestes sítios, as CTGs apresentaram sinais de degeneração acentuada, com rompimento celular, apresentando núcleo com cromatina condensada, freqüentemente picnótica em meio ao sangue extravasado (FIG.5D).

Nos sítios lesados com HM, as células NKu da R1 apresentaram alterações de classe I com predominância da classe V, ao lado de células normais de subtipos 3 e 4. Na R2, continuaram a ser observadas as alterações de classes I e V, com predominância da primeira, além de células de subtipo 4 normais. Na R3, foram observadas as alterações de classes I e V além de células normais de subtipo 3.

Nos sítios lesados com HL, as células NKu apresentaram morfologia aparentemente normal com padrão de reatividade equivalente às células encontradas nos sítios de animais controles.

24 horas pós-lesão

Algumas células NKu com alterações classes III e IV foram encontradas, ao lado de células normais de subtipos 3 e 4 na R1, em sítios lesados com padrão HG. Nestes sítios, o embrião apresentou-se rompido em meio ao sangue extravasado.

Na R2, as células NKu apresentaram alta incidência de alteração de classe III, além de células normais subtipo 4. Na R3 foram encontradas células NKu com alteração das classes III, IV e VI, com predomínio da primeira. Algumas células normais de subtipo 3 puderam ser identificadas.

As CTGs e células do endométrio próximas a estas apresentaram sinais de degeneração, juntamente com fragmentos celulares reativos à lectina DBA, possivelmente de NKu.

Nos sítios lesados com HM, a R1 apresentou NKu com alterações de classes III e IV, sendo encontradas células de subtipos 3 e 4. Na R2 foram observadas células normais do subtipo 4 e células com alterações de classes III e IV, com predominância da última. As células NKu com alterações classes III e IV foram encontradas na R3, além de células normais subtipo 4.

Os sítios lesados com padrão HA apresentaram NKu com alteração classe VI na R1 e células normais subtipos 3 e 4. Na R2 as células NKu apresentaram alteração da classe III ao lado de células normais de subtipo 4. Na R3 foi observada pequena incidência de células NKu com alteração da classe IV, ao lado de células subtipo 4.

15º ddg

Controles

Neste estágio, o endométrio que constitui a decídua basal apresentou-se pouco espesso, com a placenta fetal bastante desenvolvida com a camada labiríntica mais espessa.

Na R1 e 2, era evidente o acúmulo de NKu de subtipos 3 e 4, com aparente aumento na proporção das células de subtipo 4. Foram esporádicas as células NKu presentes nas bordas do botão placentário. Um pequeno número de NKu de subtipo 3 foi encontrado na R3, onde havia predominância de subtipo 4.

Foram observadas, neste período, as CTGs achatadas delineando a interface materno-fetal nas bordas do botão placentário.

6 horas pós-lesão

A totalidade dos sítios lesados apresentou padrão HG. Na R1 foram encontradas células NKu com alteração classe V e elevada incidência com alteração classe VI, juntamente com células normais de subtipo 4. Nas R 2 e 3, foram encontradas células NKu com alteração das classes V e VI, com predominância do último ao lado de normais subtipos 3 e 4.

Foram encontradas algumas CTGs presentes da interface placentária, com sinal de degeneração. As células da camada do labirinto aparentaram estar íntegras.

Os sítios não lesados com HM, tanto do como esquerdo quanto do direito apresentaram predomínio de células NKu alteradas de classe V na R1 com raras células com alteração classe VI, além de células normais de subtipo 4. Na R2, as células com alteração classe V predominava ao lado de células subtipo 4 normais. Na R3, foram encontradas células NKu com alteração de classe V e de subtipo 3 normal.

24 horas pós-lesão

Neste período, os sítios lesados apresentaram hemorragia dos tipos HM, HG e HA. Na HA verificou-se um número reduzido das células NKu no endométrio. Na R1, as células NKu apresentaram alterações classes V e VI com predomínio da última, junto a células de subtipo 4. Na R2, foram encontradas somente células NKu de subtipo 4. Na R3, as células encontradas eram normais de subtipo 3 com algumas com alteração da classe VI.

O acúmulo de CTGs nas bordas do botão placentário foi menos proeminente neste estágio e poucas apresentaram sinais de degeneração celular.

Os sítios lesados com HG apresentaram na R1, incidência elevada de células NKu com alteração classe V e poucas células com alteração classe VI, como também células normais de subtipo 4. Nas R 2 e 3, a maioria das células NKu apresentava alteração classe V e um pequeno número com classe VI. As células de subtipos 3 e 4 foram observadas nestas mesmas regiões em pequeno número.

Os sítios lesados com HM apresentaram predominância de células com alteração classe V ao lado de classe VI na R1 e ainda células de subtipo 4 normais. Na R2, predominaram as células com alteração classe VI, ao lado de classe V e normais de subtipo 4. Na R3 foram constatadas células com alteração somente de classe VI e normais do subtipo 3.

17º ddg

Controles

Enquanto a placenta fetal ocupava a maior área da região mesometrial, o endométrio estava bastante reduzido. As células NKu foram encontradas em número reduzido, sendo principalmente de subtipos 3 e 4, que estavam acumuladas nas R 1 e 2. Na R3, também bastante adelgada, foram encontradas raras células NKu de subtipo 3 e 4.

A placenta fetal mostrou-se constituída principalmente pela espessa camada labiríntica. A camada de CTGs era bastante delgada e estavam dispostas ao longo de toda a periferia da placenta, porém, nas bordas placentárias formavam grupos de células menos achatadas. Algumas CTGs apresentaram sinais de degeneração.

Células NKu foram encontradas esporadicamente no interior da placenta fetal, entre as lacunas formadas pelas paredes do labirinto.

6 horas pós-lesão

Na R1 dos sítios lesados com HG, foram encontradas células NKu com alteração classe VI, além de um reduzido número de células subtipo 4. Na delgada R2 (decídua basal), somente células de subtipo 4 sem nenhuma alteração. Na R3 foram encontradas NKu subtipo 4, assim como células com alteração classe VI.

As CTGs da interface apresentaram sinais de degeneração.

Os sítios lesados com HA apresentaram, principalmente, NKu com alteração classe VI na R1, juntamente com células normais de subtipo 4. Nas R 2 e 3, as células NKu encontradas também apresentaram alteração classe VI, ao lado de células normais de subtipo 4.

Em sítios não lesados que apresentaram HM, as células NKu nas R 1 e 2 apresentaram alteração classe V, além de células normais de subtipo 4. Na R3 foram observadas somente células com alteração classe VI, junto com células normais de subtipo 4.

24 horas pós-lesão

Nos sítios lesados com HG ou HM, as NKu encontradas tanto nas R 1 e 2 quanto na R3 apresentaram alterações classe VI, sendo difícil, nesta área, a identificação precisa de normalidade nas células NKu.

As raras CTGs identificadas na interface placentária estavam em degeneração acentuada neste período.

Nos sítios lesados com HA foram observadas células com alteração da classe VI, assim como algumas células normais de subtipo 4, nas R 1, 2 e 3.

5.4- Detecção de núcleo apoptótico

Nos controles realizados com cortes do timo, foram observados alguns núcleos de linfócitos presentes predominantemente na região cortical, com reação positiva.

Nos cortes de útero no 8º ddg normal utilizado como controle, foi observada reação positiva nos núcleos de células decíduais em degeneração que estavam em íntimo contato com as células trofoblásticas gigantes da região mural e nos núcleos de células decíduais e do epitélio uterino encontradas junto ao cone ectoplacentário.

Nos materiais utilizados do pós-lesão ou mesmo do controle, não foi constatada uma marcação significativa no núcleo das células NKu. Porém, nos materiais de 24 horas pós-lesão, particularmente a partir do 12º ddg, foi evidente e acentuado o número de núcleos com reação positiva nas células trofoblásticas da placenta (**FIGS.5E, F**).

Tabela 1- Incidência dos padrões de resposta nos sítios de desenvolvimento embrionário e fetal do 6° ao 17° ddg em 6 horas pós-lesão.

	Esquerdo						Direito					
	N	HL	HM	HG	HA	T	N	HL	HM	HG	HA	T
6°	5 [29]	7* [42]	0 [0]	5* [29]	0 [0]	17 [100]	7 [42]	10 [58]	0 [0]	0 [0]	0 [0]	17 [100]
8°	1 [5]	3 [15]	9* [45]	7* [35]	0 [0]	20 [100]	6 [35]	5 [30]	6 [35]	0 [0]	0 [0]	17 [100]
10°	1 [6]	6 [35]	2 [12]	8* [47]	0 [0]	17 [100]	0 [0]	7 [47]	6 [40]	2 [13]	0 [0]	15 [100]
12°	3 [16]	5* [26]	2* [11]	3* [16]	6* [31]	19 [100]	6 [40]	0 [0]	4 [27]	3 [20]	2 [13]	15 [100]
15°	6 [31]	0 [0]	5 [27]	8* [42]	0 [0]	19 [100]	10 [60]	0 [0]	7 [35]	0 [0]	1 [5]	20 [100]
17°	7 [42]	0 [0]	4 [23]	4* [23]	2* [12]	17 [100]	6 [37]	6 [37]	4 [26]	0 [0]	0 [0]	15 [100]

Padrões de resposta N- normal; HL- hemorragia lateral; HM- hemorragia mesometrial; HG- hemorragia generalizada; HA- hemorragia com atrofia; T- somatório dos sítios de 3 animais analisados; **Números em itálico**- incidências em valores absolutos; (*) tipos de hemorragias correspondentes dos sítios lesados; []- incidências em valores percentuais.

Tabela 2- Incidência dos padrões de resposta nos sítios de desenvolvimento embrionário e fetal do 6º ao 17º ddg em 24 horas pós-lesão.

	Esquerdo							Direito						
	N	HL	HM	HG	HA	T		N	HL	HM	HG	HA	T	
6º	8 [32]	12* [48]	1 [4]	4* [16]	0 [0]	25 [100]		11 [58]	4 [21]	4 [21]	0 [0]	0 [0]	19 [100]	
8º	1 [5]	6* [30]	6 [30]	6* [30]	1 [5]	20 [100]		2 [8]	11 [48]	4 [18]	6 [26]	0 [0]	23 [100]	
10º	0 [0]	3 [18]	4 [26]	6* [38]	3* [18]	16 [100]		2 [11]	4 [20]	8 [43]	2 [11]	3 [15]	19 [100]	
12º	3 [16]	1 [7]	4* [22]	3* [16]	7* [39]	18 [100]		9 [56]	1 [6]	0 [0]	1 [6]	5 [32]	16 [100]	
15º	2 [14]	2 [14]	3* [22]	5* [36]	2* [14]	14 [100]		6 [35]	5 [30]	6 [35]	0 [0]	0 [0]	17 [100]	
17º	9 [50]	0 [0]	2 [12]	6* [33]	1* [5]	18 [100]		12 [66]	0 [0]	3 [17]	0 [0]	3 [17]	18 [100]	

Padrões de resposta N- normal; HL- hemorragia lateral; HM- hemorragia mesometrial; HG- hemorragia mesometrial; HA- hemorragia generalizada; HA- hemorragia com atrofia; T- somatório dos sítios de 3 animais analisados; **Números em *itálico***- incidências em valores absolutos; (*) tipos de hemorragias correspondentes dos sítios lesados; []- incidências em valores percentuais.

Tabela 3- Distribuições e incidências dos subtipos normais de células NKu em animais controles encontradas nos sítios de desenvolvimento embrionário e fetal nos períodos estudados

	R1				R2				R3			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
ddg												
6°	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)
8°	(-)	(+)	(++)	(+)	(+++)	(++++)	(+++)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(-)
10°	(-)	(-)	(+++)	(++++)	(-)	(-)	(+++)	(+)	(+++)	(++++)	(++)	(-)
12°	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(-)	(-)	(++)	(++++)	(-)	(-)	(+++)	(+++)
15°	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(+)	(++)	(-)
17°	(-)	(-)	(+)	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)	(-)	(-)	(++)	(++)

S 1, 2, 3 e 4 – subtipos normais de NKu

R1, R2 e R3 – subdivisões da região mesometrial dos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal de acordo com a figura 2.

Incidências

(-) ausente
(+) rara
(++) pequena
(+++) moderada
(++++) elevada

Tabela 4- Distribuições e incidências das células NKu alteradas nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal com padrão de diferentes padrões de respostas hemorrágicas

ddg	6 horas												24 horas											
	R1				R2				R3				R1				R2				R3			
	HL	HM	HG	HA	HL	HM	HG	HA	HL	HM	HG	HA	HL	HM	HG	HA	HL	HM	HG	HA	HL	HM	HG	HA
6º	(-)		(-)		(-)		(-)		(-)		A-II (+++)		(-)	A-II (+++)			(-)	A-II (+++)		A-II (++)		(-)		(-)
8º		A-II (++)	A-II (++++)			A-II (+)	A-II (++++)		(-)		A-II (+++) A-V (+++)		(-)	A-II (+++) A-V (+++)			(-)	A-II (+++) A-V (+++)		A-IV (++) A-V (+++)		(-)		(-)
10º		A-II (++++) A-V (+++)	A-III (++++) A-IV (+++) A-V (++)			A-II (+++)	A-I (+) A-IV (++)				A-IV (+) A-V (++)	A-IV (+++) A-V (+++)			A-III (++) A-V (++)	A-III (+) A-IV (+++) A-V (++)		A-III (++) A-IV (+++) A-V (++)					A-IV (++) A-V (+++)	A-III (+) A-IV (+++) A-V (++)
12º	(-)	A-I (++) A-V (+++) A-VI (+++)	A-IV (+) A-V (+++) A-VI (++)	A-III (+++) A-IV (++) A-V (+++)	(-)	A-I (+++) A-V (+++)	A-IV (+) A-V (++)	A-III (+++)	(-)		A-I (+++) A-V (+++)	A-I (+) A-V (+++)			A-III (++) A-IV (++)	A-III (+++) A-IV (+++)		A-III (++) A-IV (+++)					A-III (+++) A-IV (+++) A-VI (+)	A-IV (+++) A-IV (+++) A-VI (+)
15º		A-V (+++) A-VI (+)	A-V (++) A-VI (+++)			A-V (+++)	A-V (+) A-VI (+++)				A-V (+++) A-VI (++)	A-V (+) A-VI (+++)			A-V (+++) A-VI (++)			A-V (++) A-VI (+++)		A-V (+++) A-VI (++)			A-VI (+++)	A-V (+++) A-VI (+++)
17º		A-V (+++)	A-VI (++++)	A-VI (+++)		A-V (+++)	(-)	A-VI (+++)			A-VI (+++)	A-VI (+++)			A-VI (+++)			A-VI (+++)		(-)			A-VI (+++)	A-VI (+++) A-VI (+++)

A - I, II, III, IV, V e VI – Classes de alterações das NKu

Padrões de hemorragia:

HL- hemorragia lateral;

HM- hemorragia mesometrial;

HG- hemorragia generalizada;

HA- hemorragia com atrofia

Frequências de Incidências

(-) somente células NKu normais

(+) rara

(++) pequena

(+++) moderada

(++++) elevada

6- DISCUSSÃO



Várias hipóteses levantadas para explicar a presença das células NK no ambiente uterino têm sido descartadas pela não comprovação experimental. Porém, com base nos conhecimentos acumulados sobre as células NK, duas hipóteses permanecem como passíveis de ser atribuídas a estas células presentes no ambiente uterino durante a gestação, quais sejam: a proteção do organismo materno, contra uma possível agressão das células trofoblásticas (PARR et al, 1987; STEWART, 1991; CROY, 1994; WHITELAW and CROY, 1996; HEAD, 1996-97) e produção de citocinas envolvidas na manutenção da decídua, vascularização e crescimento normal da placenta (ASHKAR and CROY, 1999; CROY et al, 2000a; ASHKAR et al, 2000).

A segunda hipótese vem sendo comprovada pelas evidências da produção de citocinas, tais como o IFN- γ , iNOS (SLADEK et al, 1998; ASHKAR and CROY, 1999; GUIMOND et al, 1999; ASHKAR et al, 2000; CROY et al, 2000a, b) e TNF- α (PARR et al, 1995; WHITELAW and CROY, 1996; GUIMOND et al, 1999) pelas NKu de camundongos. A IFN- γ tem sido demonstrada como essencial para a manutenção da decidualização, assim como para o desenvolvimento pleno da placenta fetal e do próprio feto (ASHKAR and CROY, 1999; ASHKAR et al, 2000, CROY et al, 2000a). Por outro lado, apesar da comprovada produção de importantes citocinas na manutenção da gestação pelas NKu, permanece por ser explicada a sua possível dualidade funcional, tendo em vista o arsenal citolítico contido nos grânulos destas células que se mantêm quiescentes ao longo das gestações normais.

Não há relatos de literatura que descrevam modelos experimentais para estudos da gestação anormal, exceto o trabalho de DAVIES and GLASSER (1968). Eles avaliaram o desenvolvimento placentário após a remoção dos embriões. Segundo estes autores, a placenta tem sobrevida própria, mesmo com ausência do embrião, porém limitada a 4 dias, no máximo. Não houve, contudo, qualquer menção sobre as células NK ou outras populações linfocitárias que pudessem ser encontradas nesta citação.

Os procedimentos experimentais adotados no presente trabalho visaram estabelecer um modelo de gestação anormal, para avaliar o comportamento das células NKu. Este modelo experimental consistiu em induzir à lesão mecânica dos embriões e fetos em diferentes fases de desenvolvimento para acompanhar os fenômenos localizados no útero por meio das análises macroscópicas e microscópicas.

Pelos resultados das análises macroscópicas, foi possível constatar a ocorrência anômala de hemorragias no útero, que estavam presentes de forma constante nos sítios cujos embriões ou fetos sofreram a lesão primária. Estas hemorragias que apresentaram

constâncias quanto à localização e intensidade foram classificadas em HL (hemorragia lateral), HM (hemorragia mesometrial), HG (hemorragia generalizada) e HA (hemorragia atrófica). A ocorrência destas hemorragias localizadas e de diferentes intensidades decorrentes de traumatismos mecânicos não seria surpreendente se não fossem constatados dois aspectos inusitados.

O primeiro foi a constatação da ocorrência de hemorragias na região mesometrial (HM) e não na região antimesometrial, como seria esperado. Sendo a lesão mecânica realizada sempre pela parede uterina na face antimesometrial, com o cuidado adotado para não afetar a região mesometrial, os padrões hemorrágicos resultantes não seriam decorrentes do traumatismo mecânico induzido na parede uterina da região antimesometrial.

O segundo resultado inesperado da análise macroscópica foi a constatação da propagação de iguais padrões hemorrágicos também nos sítios, cujos embriões ou fetos não haviam sido submetidos à lesão mecânica primária, isto é, ocorreram hemorragias nos sítios adjacentes no como homolateral e também no contralateral.

Por estas observações macroscópicas pode-se presumir, inicialmente, que a lesão mecânica da parede uterina em si não seja a causa promotora das diferentes hemorragias. Por conseguinte, os embriões ou os fetos lesados tornam-se os potenciais elementos de fonte primária que poderiam induzir às respostas hemorrágicas do ambiente uterino, inclusive com efeito sistêmico.

Não há relatos experimentais, na literatura, que descrevam a capacidade da massa celular embrioblástica ou do tecido fetal lesado, com ação vasoativa ou que conduzam à hemorragia. Porém, as células trofoblásticas em desenvolvimento ectópico provocam hemorragias locais decorrentes do seu hemotropismo e capacidade invasiva, atingindo o leito vascular do sítio hospedeiro (KIRBY, 1967; BEVILACQUA and ABRAHAMSHON, 1989; YAMADA, 1990; ENDERS and WELSH, 1993; FARIA and BEVILACQUA, 1995). Para este evento, exige-se o contato direto entre o trofoblasto e as células da parede dos vasos, ocasionando ruptura destes, que provoca o extravasamento sanguíneo. No entanto, em nossas análises microscópicas, tal fenômeno não foi verificado nos sítios hemorrágicos, apesar das ocorrências consideradas normais de células trofoblásticas na interface materno-fetal dos diferentes estágios da gestação.

Desta forma, presume-se que ocorra a liberação de substâncias vasoativas como consequência da lesão embrionária/fetal, embora não se possa precisar a sua origem. Embora não tenham sido realizados exames pormenorizados em outros órgãos vitais dos

animais experimentais, não foram constatadas hemorragias visíveis nos demais órgãos da cavidade abdominal ou torácica (dados não registrados). Estes resultados implicam em duas possibilidades que poderiam explicar as ocorrências das hemorragias na região mesometrial.

A primeira teria como pressuposto a liberação sistêmica de alguma substância vasoativa, com ação específica sobre as células da parede dos vasos do ambiente uterino, mas não sobre os demais órgãos. Para tanto, seria necessário presumir a expressão de receptores de membrana específicos para tais mediadores pelas células da parede de vasos presentes no útero e que não seriam expressos em vasos sanguíneos de outros órgãos. Como subsídio a esta hipótese, pode ser citado o fato de células como o fibroblasto e fibras musculares lisas do aparelho reprodutor feminino expressarem uma combinação de receptores de membrana específicos tais, como o estrógeno, progesterona, prostaglandinas, etc (OHTA et al, 1993; TAN et al, 1999; KURITA et al, 2000; CLASSEN-LINKE et al, 2000) não comuns a outros órgãos. A exemplo destes, poderiam ocorrer liberações de mediadores de origem embrionária e para os quais as células do ambiente uterino seriam capazes de responder seletivamente pela expressão de receptores de membrana correspondentes.

A segunda possibilidade exige para o pressuposto a existência de um elemento intermediário capaz de ser sensibilizado pelas alterações decorrentes da lesão embrionária. Por sua vez, este elemento, uma vez sensibilizado, teria como resposta a liberação de substâncias vasoativas de ação localizada, tipo parácrina no ambiente uterino.

Esta segunda possibilidade não exclui necessariamente a primeira, porém, considerando que nem todos os sítios encontrados no mesmo corno uterino respondem uniformemente ao mesmo estímulo (lesado e não lesado com hemorragias de diversas intensidades), a hipótese de um controle local para cada sítio de desenvolvimento embrionário torna-se funcionalmente mais aceitável. Este controle local individualizado de cada sítio é observado naturalmente nos cornos uterinos de roedores, uma vez que, ocasionalmente, um ou outro embrião pode se tornar inviável e levado à morte por atrofia e reabsorção, sem implicar no comprometimento e abortamento dos demais.

Neste contexto, qual seria este elemento mediador específico do ambiente uterino sensível e também apto a responder às alterações deste ambiente, induzindo, entre outras a uma ação vasoativa?

Pela análise correlativa dos resultados macroscópicos onde foram descritos as diferentes intensidades de hemorragias, com os dados microscópicos avaliando a celularidade destes sítios, este elemento poderia ser a própria célula NKu.

As células NKu são encontradas na gestação e exclusivamente na região mesometrial (STEWART and PEEL, 1977, 1978, 1980; CROY and KISO, 1993; CORRÊA DA SILVA, 1997). Estas células NK apresentam como potencial funcional intrínseco a capacidade de destruir a célula-alvo pela liberação do conteúdo citotóxico presente no grânulo (PETERS et al, 1991; KING et al, 1993; TRAPANI, 1998). Assim como as demais NK, estas presentes no útero, durante a gravidez, contém perforina, granzimas, enzimas hidrolíticas e TNF- α nos seus grânulos (PARR et al, 1990; ZHENG et al, 1991a, ISAAZ et al, 1995; PARR et al, 1995; CORRÊA DA SILVA et al, 1996; PLATT and HUNT, 1998), possibilitando a estas células um potencial citolítico capaz de lisar diversas células-alvos. Além do mais, comparou-se a presença do óxido nítrico sintase (NOS) no interior das NKu (SLADEK et al, 1998). Esta enzima é responsável por sintetizar o óxido nítrico, que é um potente radical livre, regulador de várias funções (HUNT et al, 1997), entre elas a vasodilatação, o relaxamento da musculatura uterina, a inibição da agregação plaquetária e a adesão leucocitária (McKENDRICK and RADOMSKI, 1998).

Pelas análises microscópicas do grupo controle, a identificação e a localização das NKu no endométrio de camundongos, baseadas inicialmente na reação do PAS, corroboram os relatos da literatura, que utilizaram a mesma metodologia (STEWART and PEEL, 1977; PEEL et al, 1983; PEEL, 1989; DELGADO et al, 1996). Da mesma forma, pela citoquímica de lectina DBA, foram identificados os subtipos de células NKu normais distribuídas na região mesometrial, à semelhança dos relatos pré-existentes (CORRÊA DA SILVA et al, 1996; CORRÊA DA SILVA, 1997; PAFFARO JR et al, 1999b).

Segundo CORRÊA DA SILVA (1997) e PAFFARO JR et al (1999a), o método citoquímico pela lectina DBA é mais sensível para a identificação das células NKu de camundongos, pelo fato de marcar tanto a superfície quanto os grânulos citoplasmáticos destas células. Pela classificação desses autores, as células pequenas semelhantes a linfócitos e que apresentam marcação na superfície celular, mas sem grânulos citoplasmáticos positivos com a lectina DBA, seriam as formas precursoras (subtipo 1) das NKu. A forma subsequente de diferenciação caracteriza-se ainda como células pequenas, mas já apresentam alguns grânulos DBA positivos (subtipo 2). A forma plenamente diferenciada de NKu seria aquela célula que apresenta grande quantidade de grânulos DBA positivos (subtipo 3) em seu citoplasma. Estas células seriam aquelas reconhecidas e

descritas por outros autores (SMITH, 1966; LARKIN and FLICKING, 1969; STEWART, 1987; WELSH and ENDERS, 1993; CROY and KISO, 1993) pela técnica de PAS como as formas típicas de NKu. Além destas formas, são encontradas as maiores, que apresentam grânulos DBA positivos em meio ao citoplasma amplo de aspecto extraído (subtipo 4). Estas últimas seriam as descrições correspondentes às células NKu em estágio final da diferenciação, tendendo já para a degeneração (DELGADO et al, 1996; CROY et al, 1997; CORRÊA DA SILVA, 1997).

Pelo conceito morfofuncional acima, seria NKu correspondente ao subtipo 3, a forma madura apta a responder aos estímulos específicos para a atuação funcional plena. Porém, esta afirmação ainda não pode ser confirmada, por não haver experimentos que comprovem a atividade funcional *in loco* particularmente da citotoxicidade destes subtipos celulares de maturação no ambiente uterino.

Nas análises dos grupos experimentais processados pelo método citoquímico de lectina DBA, identificaram-se detalhes de alterações morfológicas das NKu presentes nos sítios hemorrágicos, não perceptíveis pela reação de PAS ou pelas colorações histológicas convencionais. Estas alterações descritas em resultados que classificaram as NKu de classes I a VI, demonstram que estas células foram afetadas nos sítios que apresentaram resposta hemorrágica das classes HM, HG e HA.

Entre as formas alteradas de NKu, chamaram particular atenção aquelas em que se verificou a perda ou alteração no padrão de marcação no conteúdo dos grânulos (classes I, II, III e V), sugerindo a ocorrência de degranulação.

A liberação do conteúdo dos grânulos das células NK, relacionadas com a sua atividade citolítica, tem sido demonstrada *in vitro*, onde o contato destas com as células-alvo induz à rápida degranulação do conteúdo citolítico, com a morte das células-alvo por apoptose (PETERS et al, 1991; TRAPANI, 1995, 1998). Este fenômeno é induzido pela ação da IL-2 nas NK em geral (PODACK, 1985; LIU et al, 1989; TRINCHIERI, 1989; OJCIUS and YOUNG, 1990), porém não foi confirmado para as NK obtidas do útero prenhe (CROY et al, 1997).

A lectina DBA tem como característica a alta especificidade para resíduos de N-acetil-D-galactosamina, localizados em porções terminais (ETZLER and KABAT, 1970; WATANABE et al, 1981; PEEL and BULMER, 1996; PAFFARO JR et al, 1999a). Desconhece-se, até este momento, qual(is) seria(m) o(s) glicoconjugado(s) substrato(s) contido(s) nos grânulos da NKu de camundongos e quais papéis fisiológicos teriam. Não se pode atribuir, portanto, a este glicoconjugado a ação efetora citolítica/citotóxica. Porém, a

sua coexistência no compartimento secretor do grânulo (CORRÊA DA SILVA et al, 1996), onde estão contidas as granzimas e a perforina (PARR et al, 1987, 1990; ZHENG et al, 1991a), permite afirmar que o glicoconjugado reativo à lectina DBA seria um marcador por excelência do conteúdo dos grânulos das NKu e a lectina DBA, por sua vez, um marcador seletivo destes grânulos.

Embora o fenômeno da degranulação das células NKu não tenha sido experimentalmente confirmado até o momento, o fato das células NKu alteradas presentes nos sítios hemorrágicos perderem o conteúdo granular reativo à lectina DBA é um forte indício de que ocorrera a perda parcial ou total deste conteúdo.

Estes resultados, mesmo que constantes, não apresentam consistência para uma explicação plausível sobre a diversidade de alterações encontradas para as NKu presentes nos sítios hemorrágicos, caso não se considere a existência de sub-populações funcionais de células NKu, isto é, as diversas formas de alterações encontradas para as NKu nos sítios hemorrágicos podem estar relacionadas com um potencial de resposta diferenciada das NKu dependentes do seu estágio de maturação. Aquelas funcionalmente maduras responderiam de imediato ao estímulo, porém as outras viriam a responder à medida que atingissem a competência funcional.

Por outro lado, um dos experimentos paralelos conduzidos em nosso laboratório apresentou outros dados relevantes (TIBA, comunicação pessoal). Utilizando o mesmo modelo experimental de lesão embrionária em animais do 8º ddg observou-se que a reatividade do conteúdo dos grânulos das NKu à lectina DBA desaparecia no período inferior a 30 minutos pós-lesão embrionária à semelhança do que se observa na alteração da classe I. Porém, a reatividade nos grânulos é restaurada no período de 2 a 3 horas pós-lesão e, em 6 horas pós-lesão ocorrem células NKu com igual aspecto ao aqui descrito como alteração classe II.

Sob a luz destes dados adicionais de TIBA et al (2000), torna-se claro que as células NKu apresentam uma dinâmica funcional peculiar. Estas células são capazes de responder ao estímulo da lesão embrionária com a liberação do seu conteúdo granular e em seguida restaurar este conteúdo rapidamente. As NKu alteradas (II, III, IV e V) em nossos experimentos, encontradas no período de 6 horas pós-lesão, seriam, portanto, na sua grande maioria, aquelas que já perderam, em algum momento, o seu conteúdo granular e estão reconstituindo "de novo" esse conteúdo.

Esta constatação comprova que as células NKu, após a sua ativação com perda do conteúdo do grânulo, não implicam necessariamente em sua morte ou degeneração à

semelhança do que é descrito para as NK circulantes (WHITELAW and CROY, 1996). Ao contrário, as formas alteradas que apresentam marcação nos grânulos poderiam ser as NKu em diferentes estádios de recuperação do seu conteúdo granular, como foi descrito por ISAAZ et al, (1995).

As NKu com alterações (III, IV e V) referem-se àquelas que perderam parcial ou totalmente a marcação pela lectina DBA, na superfície celular. De acordo com FONSECA (2000), a lectina DBA interage com o glicoconjugado presente na superfície das células NKu *in vitro*, induzindo inicialmente à formação de uma reação de capuz na membrana plasmática, seguida de lise da célula. Tal dado sugere que o glicoconjugado reativo à lectina DBA presente na superfície das NKu seria um importante receptor de membrana destas células. Assim, as formas alteradas encontradas em nossos experimentos, apresentando ausência ou redução de reatividade na superfície celular pela lectina DBA, reproduzem a perda, a ausência ou a redução temporal do receptor expresso na superfície celular, o qual deve ter um importante papel no controle da ativação das NKu. Este é um aspecto que merece ser investigado em profundidade no futuro, para avaliar as suas implicações na fisiologia destas células.

As NKu que apresentaram alteração da classe VI e que sofreram aparentemente lise e ruptura celular representam uma exceção à regra de restauração dos grânulos. O comportamento dessas células foi observado com maior incidência nos períodos finais da gestação. Após o 15º ddg e considerando o 17º ddg como o período mais representativo do subtipo 4 de NKu, o qual é caracterizado como de fase degenerativa, é plausível supor que estas células, uma vez sofrendo o fenômeno da degranulação, possam ter perdido a capacidade de restauração dos grânulos, acelerando assim, a degeneração.

Para a compreensão das incidências das NKu com as diferentes classes de alterações, nos diferentes tipos de hemorragia, ao longo do período de gestação, devem, portanto, ser levados em consideração os subtipos de maturação presentes em cada uma das áreas da região mesometrial dos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal.

Conforme foi descrito em resultado, as reações hemorrágicas com a incidência maior das formas alteradas foram verificadas a partir do 8º ddg, tendo o pico aparente, ao redor do 12º ddg e que este, decrescia a partir do 15º ddg. Nestas alterações devem ser consideradas a capacidade de degranulação da NKu e a sua possível restauração, pelo que se subentende que, a NKu poderia ser ativada novamente, sob um estímulo continuado ou sob um novo estímulo.

Já nos dois extremos dos animais experimentais, temos de um lado, representada pelo 17º ddg, a ocorrência da alteração classe VI e no outro, o 6º ddg em 6 horas pós-lesão, em que não se verificam formas alteradas de NKu. No 6º ddg normal, ocorrem apenas subtipos 1 e 2 de células NKu (PAFFARO JR et al, 1999b), para as quais pode-se inferir que ainda não tenham atingido a maturidade funcional para responder plenamente aos estímulos exógenos de ativação. Já no período de 24 horas pós-lesão, que equivale ao 7º ddg, foi observada alterações nas NKu. Período este em que também é encontrado o subtipo 3 nas áreas próximas ao embrião e intermediárias do endométrio mesometrial. A alteração classe II encontrada seria, portanto, originária do subtipo 2 que se diferencia, em algum momento, no decorrer deste período pós-lesão, para o subtipo 3, capacitado a responder tardiamente ao estímulo da lesão. Corrobora com esta hipótese o fato de não serem constatadas formas alteradas, onde se concentram normalmente os subtipos 1 e 2. As áreas em que foram encontradas formas alteradas coincidem com aquelas onde há incidências de subtipos 3.

Por conseguinte, torna-se claro que somente as NKu que tivessem atingido um determinado grau de diferenciação seriam capazes de desencadear a perda do seu conteúdo granular, como resposta ao estímulo da lesão embrionária/fetal.

Desta forma, a incidência concomitante de NKu com diferentes formas de alteração, numa área, num dado momento pós-lesão, seria em decorrência da existência da graduação nos níveis de diferenciação das NKu ao longo da gestação e sua distribuição na região mesometrial de cada sítio.

Consustanciam esta hipótese os nossos resultados que claramente demonstram a incidência maior de formas alteradas, nos períodos da gestação, que apresentam alta incidência de NKu plenamente diferenciada, isto é, a partir do 9º ddg que corresponde, em nosso experimento, ao período de 24 horas pós-lesão do 8º ddg.

Como regra geral, as NKu que apresentaram alterações morfológicas estiveram presentes nos sítios com padrões de hemorragias HM, HG e HA. A exceção foi a HL, onde as células NKu encontradas eram todas de subtipos normais. Salienta-se o fato de que, na HL, o acúmulo de sangue extravasado ocorre na luz uterina do segmento de interimplantação, onde pode ocorrer acúmulo de sangue extravasado mesmo em gestação normal. A luz uterina em camundongo prenhe é mantida na sua forma original, apenas nos segmentos de interimplantação, uma vez que os segmentos presentes em cada um dos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal são obliterados com perda do revestimento

epitelial (ABRAHAMSOHN and ZORN, 1993; WELSH and ENDERS, 1993). Uma nova luz uterina é formada pela coalescência de tecido epitelial neoformado, a partir das glândulas uterinas remanescentes que permanecem na região antimesometrial. Assim, seria normal a drenagem de sangue extravasado para esta luz, particularmente se originária de algum traumatismo da região antimesometrial.

Salienta-se que entre os sítios submetidos à lesão embrionária, o padrão HL foi observado já no 6º ddg em 6 horas pós-lesão. Neste período, as NKu ainda presentes em pequena quantidade na região mesometrial são, na sua grande maioria, do subtipo 1 e raras do subtipo 2 (PAFFARO JR et al, 1999b), as quais são consideradas formas imaturas (PEEL and BULMER, 1977; STEWART and PEEL, 1977; CORRÊA DA SILVA, 1997). Desta forma, ao padrão HL não pode ser atribuído o envolvimento direto das células NKu.

Já os demais sítios hemorrágicos (HM, HG e HA), onde foram encontradas as NKu com diversas classes de alterações podem ser interpretados como uma graduação de intensidade de resposta frente à lesão embrionária ou fetal, porém, devem ser consideradas, nestes fenômenos, as peculiaridades do procedimento e do estágio da gestação.

Nos resultados, tanto em HG quanto em HA foi observado que o embrião ou o feto apresentavam sinais nítidos de degeneração. O procedimento de lesão mecânica adotada tem como premissa romper a integridade do embrião/feto, levando-os à morte e degeneração. Neste procedimento, no qual foi adotada a introdução de um instrumento perfuro-cortante na parede uterina da face antimesometrial, pode ocorrer também a ruptura do revestimento trofoblasto-endométrio parietal do saco vitelino, com provável extravasamento de sangue materno para o seu interior. Em se tratando da fase fetal, neste mesmo espaço também deve ocorrer o extravasamento do sangue oriundo do feto lesado. Contudo, no momento da realização do procedimento não se pode ter a certeza da extensão da lesão provocada.

Desta forma, embora o padrão HG, quando visto macroscopicamente, possa aparentar uma resposta mais intensa de hemorragia do que uma HM, esta pode ter sido do traumatismo mecânico que se soma à resposta própria da região mesometrial. Não se pode determinar, nestas análises, quais HG seriam decorrentes apenas do traumatismo mecânico da lesão. Porém, a baixa incidência de HG entre os padrões hemorrágicos encontrados no corno direito (contralateral) em relação ao esquerdo (homolateral) fala a favor desta hipótese.

Por outro lado, a ocorrência de um padrão hemorrágico como a HG é a certeza de que houve de fato a ruptura da integridade do embrião/feto pelo procedimento de lesão adotado. Assim, também seriam esperadas, nestes sítios, as maiores respostas morfofuncionais deste modelo experimental, como de fato foram constatadas.

Quanto ao HA, deve-se ter o mesmo cuidado tomado para o HG na interpretação quanto à intensidade de reação. Presume-se que todo os HG contendo embrião ou feto lesado avance para o quadro de HA, isto é, com a atrofia de toda a massa celular contida no sítio afetado, que se acentua com o decorrer do período pós-lesão (aumento de incidência deste tipo de hemorragia nos sítios lesados dos cornos esquerdos, após 24 horas da lesão).

Torna-se claro que o conjunto de alterações que acompanham os sítios com HM, HG e HA é aquele que aparenta ser as formas representativas das respostas inerentes ao modelo experimentalmente proposto envolvendo as células NKu. Neste contexto, avaliando a somatória das incidências relativas destas alterações nos cornos esquerdo e direito ao longo de cada dia de gestação analisado, a partir do 8º ddg este conjunto supera a marca dos 50%, mantendo-se ao redor de 60% até o 15º ddg e voltando a ser inferior a 50% no 17º ddg. Por estes resultados constata-se que as reações mais intensas coincidem com o período da maior incidência de células NKu presentes nos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal.

Segundo AMARANTE (1997), no decorrer da implantação embrionária e placentação em camundongos, a atividade invasiva das células trofoblásticas gigantes apresenta uma curva que atinge o platô ao redor do 9º ddg e se mantém até o 15º ddg. PAFFARO JR et al (1999b), em suas análises quantitativas, demonstram a maior incidência de NKu maduras a partir do 9º ddg e declínio após o 15º ddg. Esta coincidência cronológica sugere uma relação direta das NKu no controle da invasividade das células trofoblásticas gigantes na interface materno-fetal.

O modelo experimental da indução da lesão, aqui preconizado, pressupõe uma eventual resposta uterina, contra as CTGs que poderiam ter a atividade invasiva alterada ou descontrolada, após a lesão do embrião ou do feto. Este potencial invasivo descontrolado e exacerbado das CTGs tem sido demonstrado por experimentos de transplantes ectópicos de embrião, onde o embrião íntegro seria o fator determinante para o controle da atividade invasiva (KIRBY, 1967).

Na realidade, não foi observada, no presente experimento, uma alteração significativa das células trofoblásticas gigantes presentes nos sítios hemorrágicos e tampouco foram

realizados ensaios que pudessem determinar uma maior ou menor atividade invasiva dessas células.

A atividade citotóxica das células NK é observada a partir do contato e reconhecimento das células-alvo, quando ocorre a liberação da perforina juntamente com as granzimas (BERKE, 1995; LOWIN et al, 1995; GREENBERG and LITCHFIELD, 1995). A perforina insere-se na membrana da célula-alvo e pelo poro formado, as granzimas introduzidas no citoplasma da célula-alvo ativam entre outras, a via da caspase, desencadeando a via da apoptose (SHRESTA et al, 1998; TRAPANI, 1998).

Nos ensaios citoquímicos realizados para a identificação de núcleos em apoptose foram constatadas algumas CTGs com reação positiva, nos sítios HM e HG 24 horas pós-lesão. Este método detectou que a placenta como um todo pode sofrer apoptose após a lesão fetal, no período de 24 horas pós-lesão, sem afetar as células do endométrio ou do restante da parede uterina.

O desencadeamento da apoptose em uma célula pode ter várias causas indutoras. Porém, a presença das células NK que, uma vez ativadas, têm como mecanismo intrínseco a capacidade de induzir apoptose em células-alvo, elege-as como as responsáveis por este fenômeno observado nas células trofoblásticas.

Existem algumas peculiaridades não descritas para as células NK em geral, mas constatadas para as NK presentes no ambiente uterino por meio deste experimento. Na primeira, as células NKu podem ser ativadas e induzidas ao fenômeno da degranulação, sem a necessidade do contato físico com as células-alvo, isto é, as NKu não demonstraram qualquer movimento de afluência para um ou outro compartimento do útero lesado especificamente junto às células trofoblásticas ou mesmo no embrião lesado. A outra está no pressuposto de que se realmente ocorreu a degranulação do conteúdo citolítico pelo mecanismo de secreção convencional por exocitose, por que não atuaram de forma indistinta nas demais células uterinas próximas, lisando-as?

Intrigante também é a ocorrência das hemorragias nos sítios presentes no corno uterino direito, não manipulado para indução da lesão.

Nestes sítios hemorrágicos não manipulados, foi encontrada igual incidência de células NKu alteradas, o que confere uma forte ação sistêmica do fator que desencadeia estes fenômenos, induzindo até a casos de hemorragia generalizada e atrófica. Embora isto configure a relação direta entre a hemorragia e as células NKu, não se pode determinar se a degranulação das NKu é a causa da hemorragia, ou se a hemorragia seria

uma das causas indutoras da alteração das NKu. Em ambos os casos, o que seria este fator?

As questões que surgiram do resultado deste modelo experimental demonstram a complexidade do ambiente uterino durante a gestação, onde a ruptura do equilíbrio em um sítio embrionário pode induzir inclusive alterações sistêmicas capazes de afetar o restante do ambiente uterino.

7- CONCLUSÕES

Pelas análises dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- As lesões provocadas mecanicamente nos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal provocam hemorragias de diferentes intensidades nos sítios lesados e aleatoriamente nos sítios não lesados.

- As células NKu encontradas nos sítios com hemorragia mesometrial (HM), generalizada (HG) e atrófica (HA) apresentam alterações no padrão de reatividade à lectina DBA.

- A presença de células NKu com alteração nos sítios com incidência elevada de hemorragia (HM, HG e HA), sugere correlação direta entre os dois fenômenos.

- Entre as alterações de células NKu detectadas pela citoquímica de lectina DBA, as que mostraram ausência de marcação nos grânulos sugerem a ocorrência do fenômeno de degranulação.

- As incidências de hemorragias de maior intensidade (HM, HG e HA) coincidem com o período da prenhez em que é encontrado o maior número de células NKu diferenciadas.

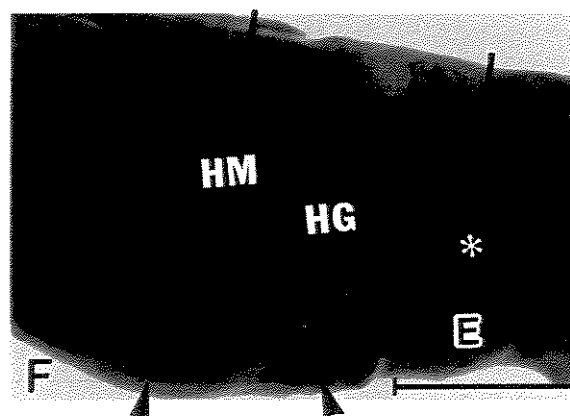
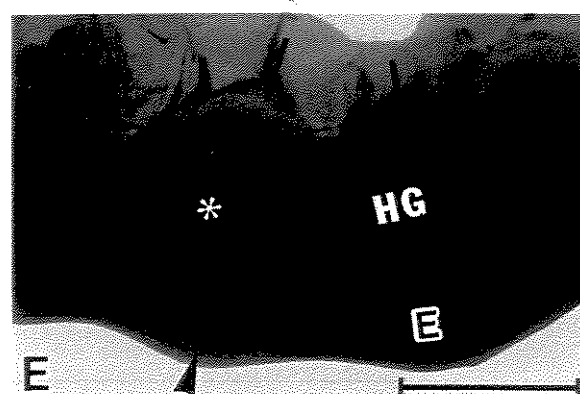
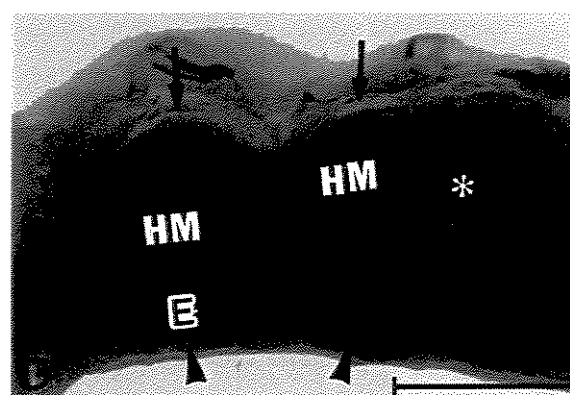
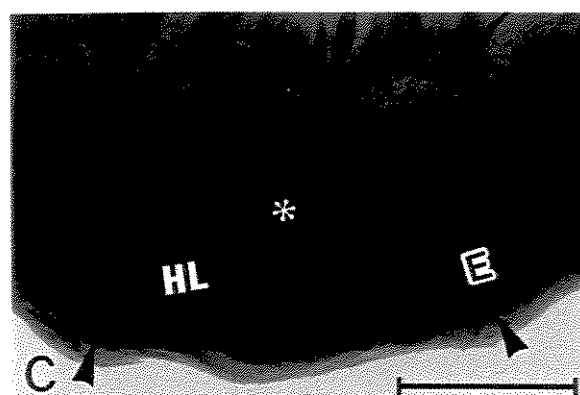
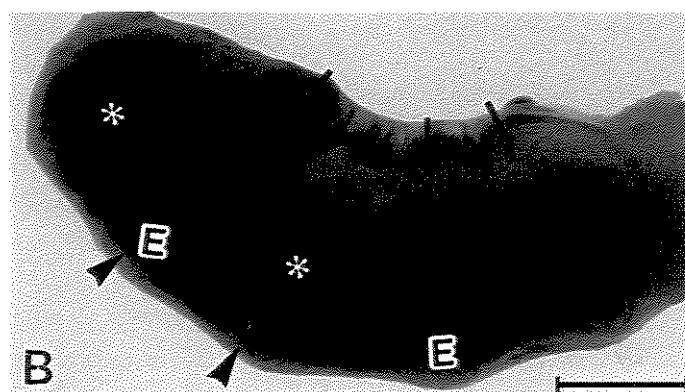
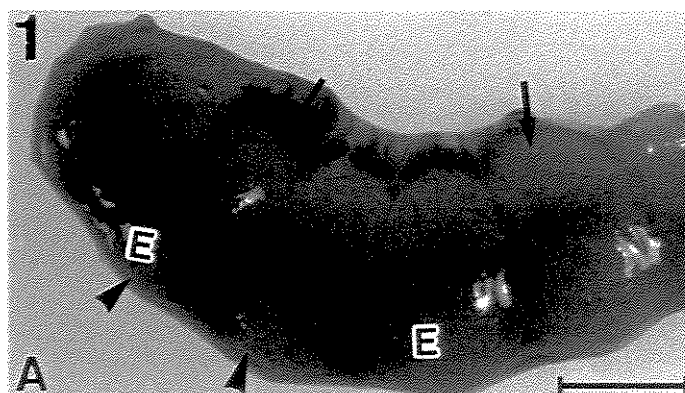
- O aumento significativo na quantidade de núcleos apoptóticos em células trofoblásticas em detrimento dos demais nos sítios lesados sugere uma ação seletiva oriunda das células NKu sobre as células trofoblásticas.

- A lesão do sítio embrionário/fetal pode ser usada como um modelo experimental para estudos *in situ* de ativação das células NKu.

8- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

FIG. 1- Aspecto macroscópico de segmentos de cornos uterinos com sítios de implantação embrionária (E) no 10º ddg normais (A e B) e lesados (C-F). As áreas escuras observadas com a transiluminação (B-F) correspondem ao acúmulo maior de sangue, de ocorrência normal na base do triângulo mesometrial de cada sítio (*) (B) e anômalas nos sítios lesados (C-F) na forma de hemorragias laterais- HL (C); mesometrial- HM (D e F); generalizada- HG (E e F). Setas – região mesometrial; cabeças de setas- região antimesometrial.

Barra= 0,5 cm.



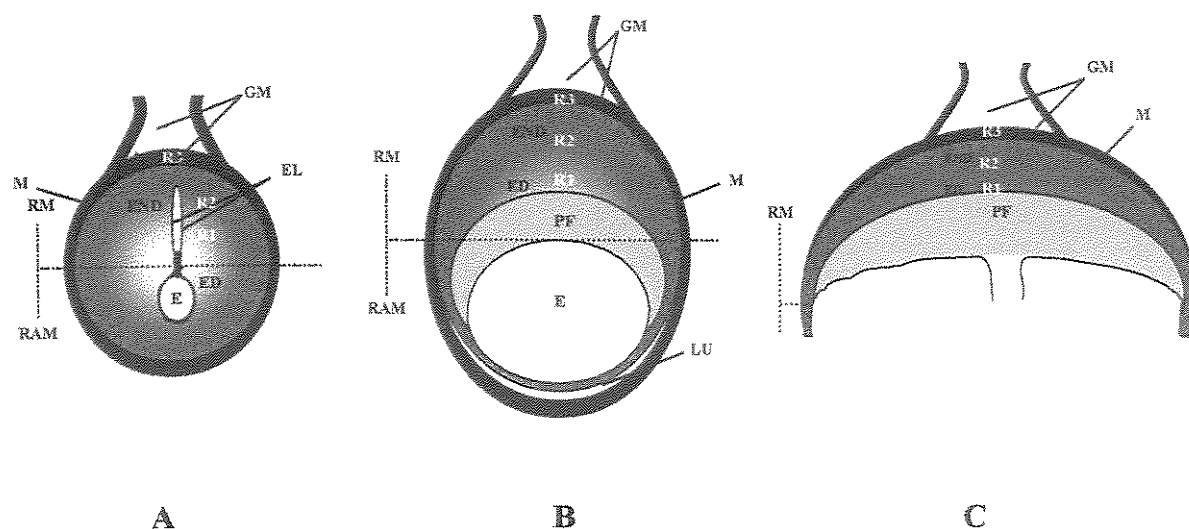


FIG. 2- Esquema de cortes transversais dos sítios de desenvolvimento embrionário ou fetal em camundongos, no 6º ddg (A); 12º ddg (B); 15º ddg (C). RM, região mesometrial, RAM, região antimesometrial; M, miométrio, GM, região da glândula metrial; LU, luz uterina; EL, epitélio luminal; E, embrião; ED, endométrio decidualizado; END, endométrio não decidualizado; PF, placenta fetal; R1, área do endométrio proximal em relação ao cone ectoplacentário ou a placenta em desenvolvimento; R2, área intermediária do endométrio decidualizado e/ou não decidualizado; R3, endométrio basal junto com o miométrio e glândula metrial.

FIG. 3

(A, B)- Fotomicrografias mostrando aspecto de sítios uterinos normais: (A e B)- cortes transversais dos sítios de implantação normais nos 8º e 12º ddg, respectivamente. Observar a região antimesometrial, local onde se encontra o embrião/feto em desenvolvimento (E/F) e a região mesometrial, onde se desenvolve o cone ectoplacentário (CE) e a placenta (P) e acima as áreas com acúmulo de células NKu (pontos castanhos escuros) (*). Endométrio decidualizado (ED); endométrio não decidualizado (END); luz uterina (LU); camada do miométrio (cabeça da seta); região da glândula metrial (GM). Citoquímica DBA + hematoxilina. 20X

C) Fotomicrografia mostrando células NKu normais apresentando grânulos PAS positivos amilase resistente (setas). Células do estroma (cabeças de seta). PAS + hematoxilina. 150X

D, E, F) Fotomicrografias de células NKu em detalhe, mostrando os subtipos identificados pela reação de lectina DBA. **D)** Observar células NKu do subtipo 1 (seta) com marcação apenas na superfície celular e subtipo 2 (cabeça de seta) com marcação na superfície celular e no grânulo. **E)** Observar células NKu do subtipo 3 (seta) com grânulos citoplasmáticos evidentes. **F)** Observar células do subtipo 4 (seta) com amplo citoplasma de aspecto extraído, e subtipo 3 (cabeça de seta). (*) Núcleos das células do estroma. Microscopia de Interferência de Normasky. Lectina DBA + hematoxilina. 1100X

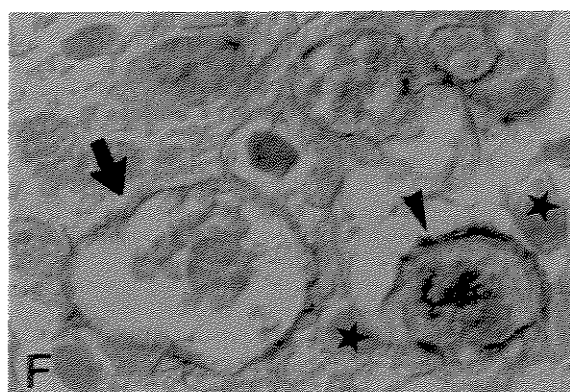
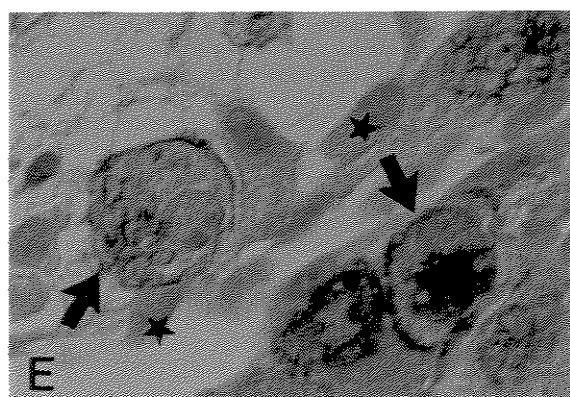
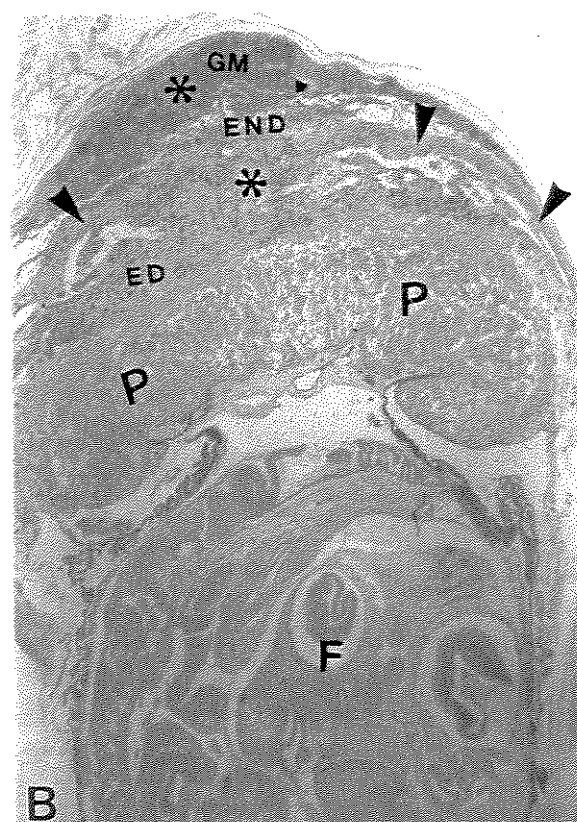
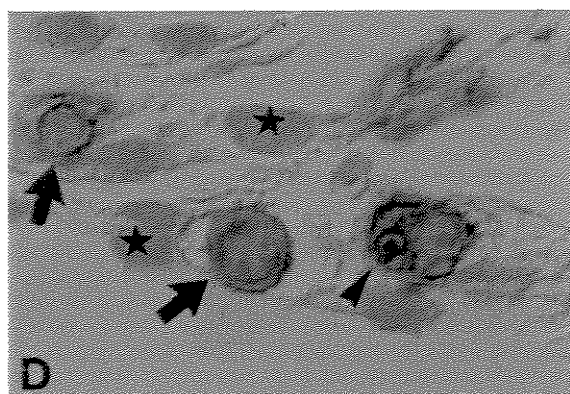
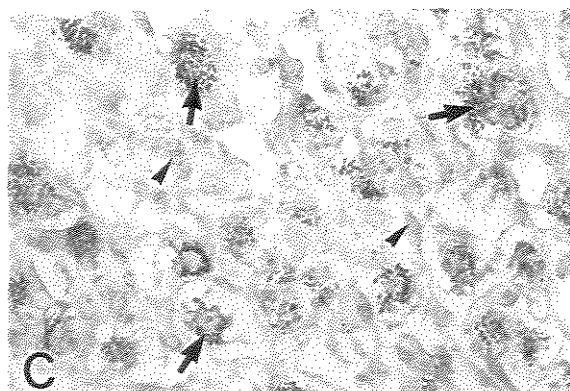
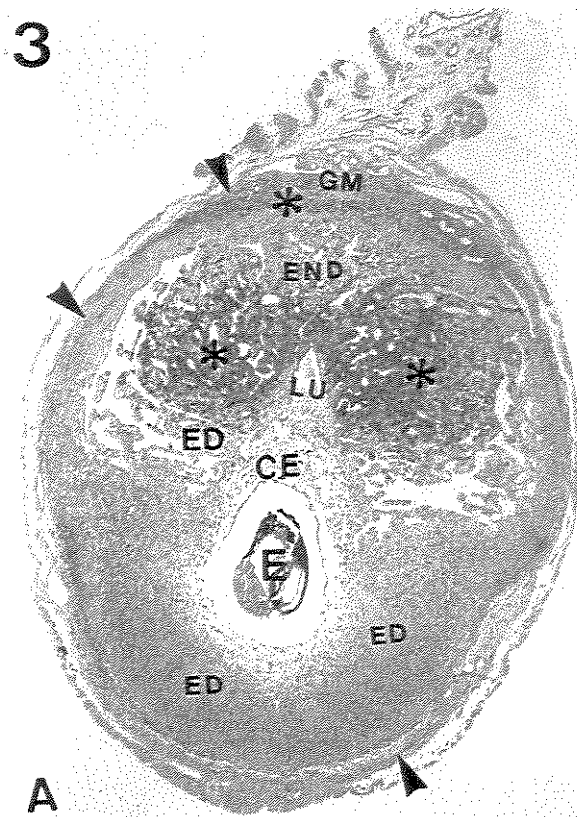


FIG. 4A, B, C, D, E, F- Fotomicrografias mostrando as alterações encontradas nas células NKu nos sítios submetidos à lesão, identificadas pela citoquímica de lectina DBA. **A)** Células NKu com alteração classe I. **B)** Células NKu com alteração classe II. **C)** Células NKu com alteração classe III. **D)** Células NKu com alteração classe IV. **E)** Células NKu com alteração classe V. **F)** Células NKu com alteração classe VI. Citoquímica de lectina DBA + hematoxilina em Microscopia de Interferência. **A, C, D, F** - 1250X; **B, E** - 1000X

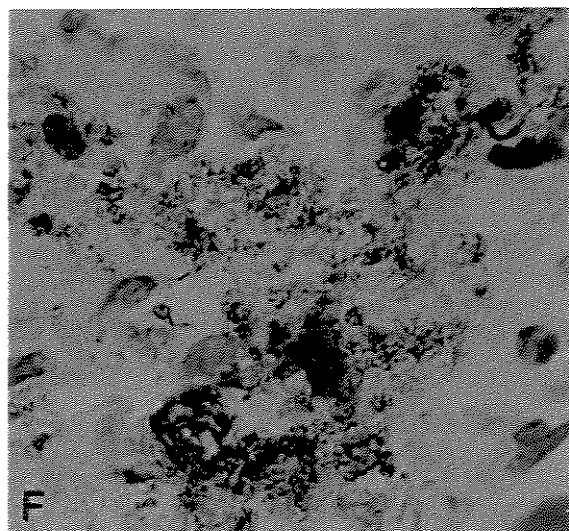
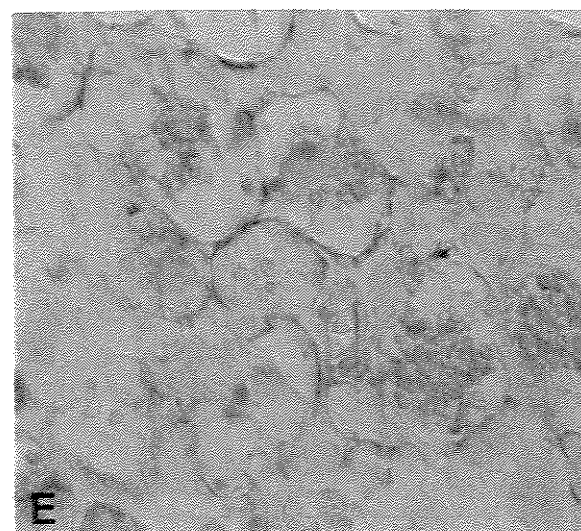
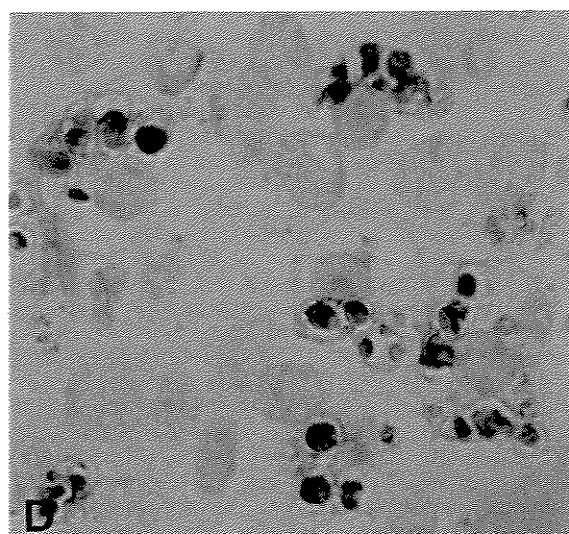
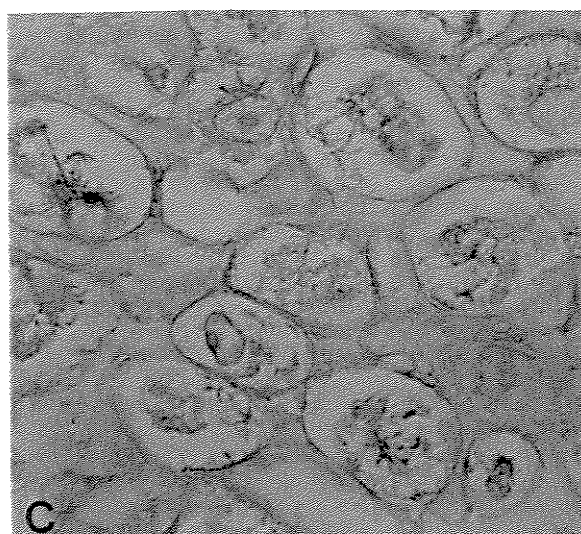
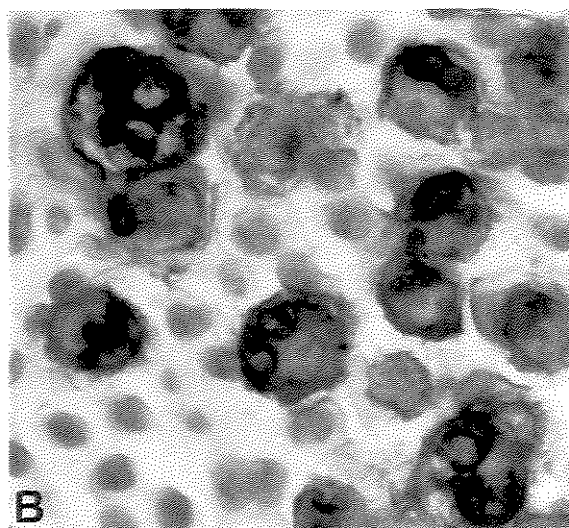
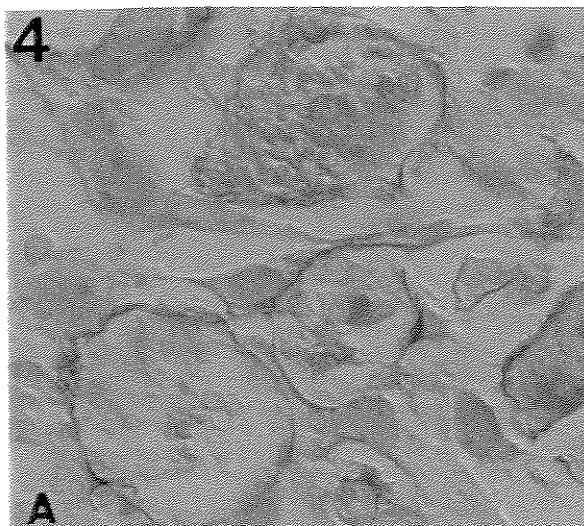


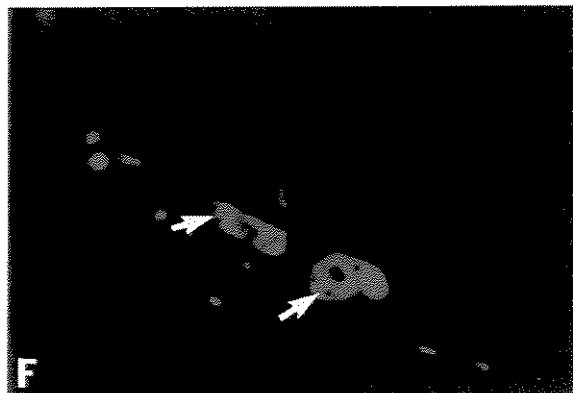
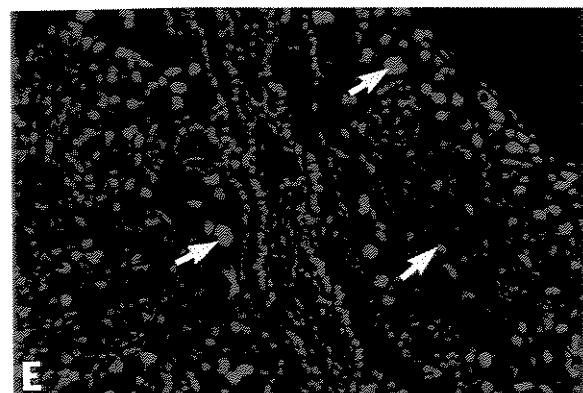
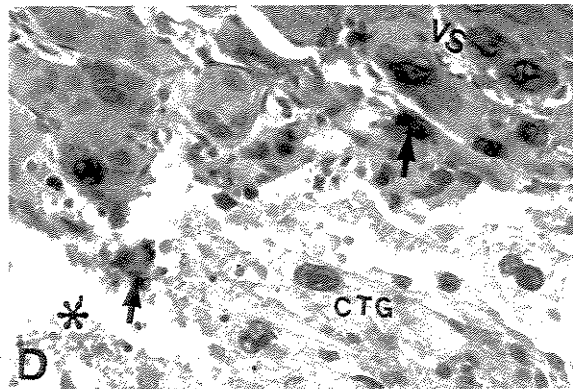
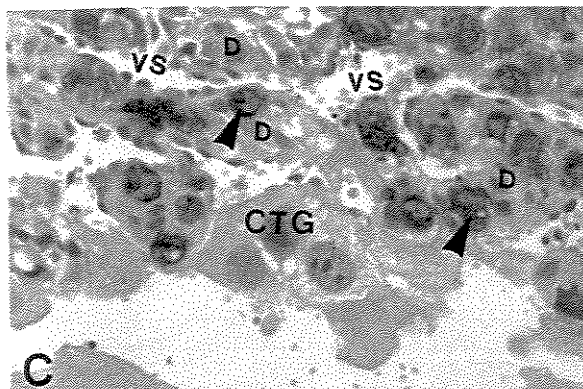
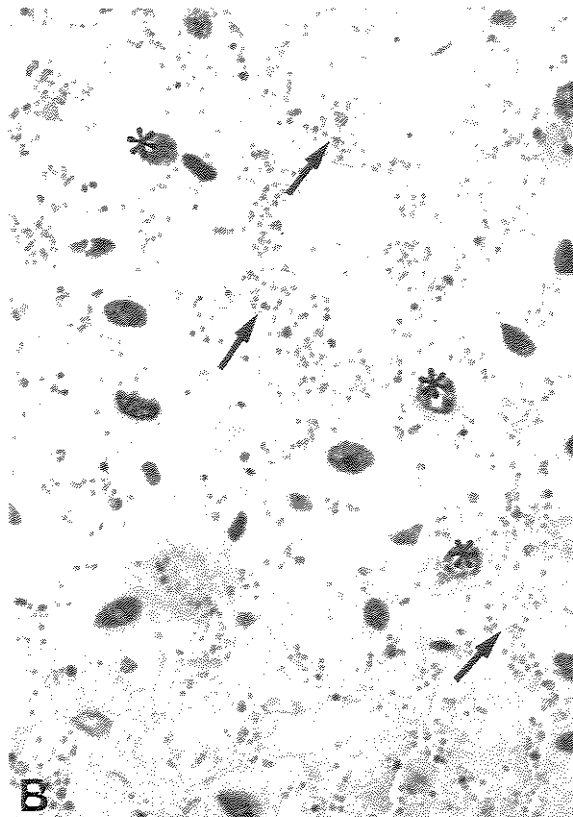
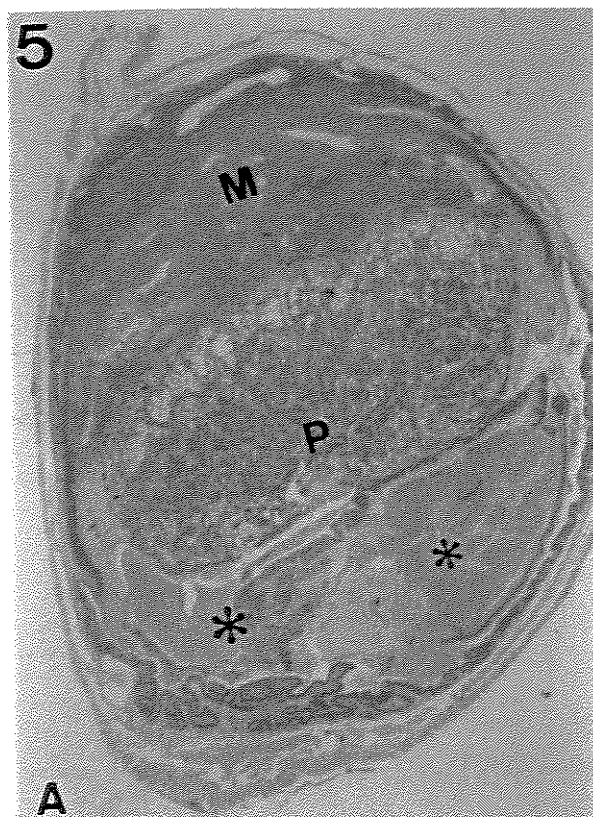
FIG. 5

A, B- Fotomicrografias mostrando aspectos dos sítios lesados com hemorragia generalizada. A) Corte transversal do sítio de implantação lesado no 12º ddg, 6 horas após a lesão. Observar a massa celular do feto totalmente desorganizado com infiltração sanguínea (*). A placenta apresenta-se desorganizada, com a perda da estratificação característica das camadas (P). Notar que na região mesometrial (M) permanece o acúmulo de células NKu evidenciadas em castanho pela citoquímica de lectina DBA. B) Detalhe de uma região com massa celular embrionária (*) infiltrado com sangue materno (setas). 20X e 150X, respectivamente.

C) Observar as células NKu normais (cabeças de setas) junto às células trofoblásticas gigantes (CTG) normais, na interface materno/fetal de um sítio normal. Traves de células decíduais (D); Vasos sanguíneos (VS). 200X

D) Observar células NKu (setas) alteradas, próximas às células trofoblásticas gigantes (CTG) em degeneração, em meio ao sangue extravasado (*), presente no sítio lesado com hemorragia generalizada, no 10º ddg, 24 horas pós-lesão. Vasos sanguíneos (VS). 200X

E e F) Microscopia de fluorescência de uma área do labirinto da placenta no 15º ddg, 24 horas após a lesão embrionária, mostrando reação positiva para apoptose nos núcleos da maioria das células (setas). Em F detalhe, mostrando reação positiva para apoptose no núcleo das células trofoblásticas gigantes (setas). 100X e 200X, respectivamente.



9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, **166**: 263-274, 1983.
- ABRAHAMSOHN P.A and ZORN T.M.T. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, **266**: 603-628, 1993.
- ALBERTO-RINCON M.C; ZORN T and ABRAHAMSOHN P.A. Diameter increase of collagen fibrils of the mouse endometrium during decidualization. **Am. J. Anat.**, **186**: 417-429, 1989.
- AMARANTE A.M. Estudo imunocitoquímico das catepsinas D e B em células trofoblásticas gigantes de camundongos. Campinas. 1997, 97p. (Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas).
- AMOROSO E.C.P. Placentation. In: Marshall's Physiology of Reproduction. Parkes A.S. 3 ed. London, Logman, 127-311, 1952.
- APLIN J.D; CHARLTON A.K and AYAD S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. **Cell. Tissue. Res.**, **253**: 235-240, 1988.
- APLIN J.D and JONES C.J.P. Extracellular matrix in endometrium and decidua. In: Placenta as a Model and Source. Genbacev O; Klover A; Beaconsfield R. eds. New York, Plenum Press, 115-128, 1989.
- APLIN J.D and GLASSER S.R. The interaction of trophoblast with endometrial stroma. In: Endocrinology of embryo-endometrium interactions. Glasser S.R; Mulholland J; Psychoyos A. eds. New York, Plenum Press, 327-341, 1994.
- APLIN J.D; HAIGH T; VISCOVAC L.J; CHURCH H.J and JONES C.J.P. Anchorage in the developing placenta: an overlooked determinant of pregnancy outcome? **Hum. Fertil.**, **1**: 75-79, 1998.
- ARCK P; DIETL J and CLARK D. From the decidual cell internet: trophoblast-recognizing T cells. **Biol. Reprod.**, **60**: 227-233, 1999.
- ASHKAR A.A and CROY B.A. Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.**, **61**: 493-502, 1999.
- ASHKAR A.A; Di SANTO J.P and CROY B.A. Interferon- γ contribute to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity and uterine natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, **192**: 259-269, 2000.
- AVRIL T; JAROUSSEAU A-C; WATIER H; BOUCRAUT J; LE BOUTEILLER P; BARDOS P and THIBAUT G. Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves na HLA class I-independent mechanism. **J. Immunol.**, **162**: 5902-5909, 1999.

- BACH E.A; AGUET M and SCHREIBER R.D. The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 563-591, 1997.
- BEEL S.C. Decidualization: regional differentiation and associated function. *Oxf. Ver. Reprod. Biol.*, **5**: 220-271, 1983.
- BENDELAC A; RIVERA M.N; PARK S.H and ROARK J.H. Mouse CD1-specific NK1 T cells-development, specificity and function. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 535-562, 1997.
- BERKE G. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol. Today.*, **16**: 343-346, 1995.
- BEVILACQUA E.M.A.F and ABRAHAMSOHN P.A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. *Arch. Biol. Med. Exp.*, **22**: 107-108, 1989.
- BEVILACQUA E.M.A.F; FARIA M.R. and ABRAHAMSOHN P.A. Growth of mouse ectoplacental cone cells in subcutaneous tissue. Development of placental-like cells. *Am. J. Anat.*, **192**: 382-399, 1991.
- BOSSI G and GRIFFITS G.M. Degranulation plays in essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat. Med.*, **5**: 90-96, 1999.
- BRAGA V.M.M and GENDLER S.J. Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J. Cell Sci.*, **195**: 397-405, 1993.
- BUENDÍA A.J; SÁNCHEZ J; MARTÍNEZ M.C; CÁMARA P; NAVARRO J.A; RODOLAKIS A and SALINAS J. Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.*, **66**: 2128-2134, 1998.
- BULMER D. The histochemical distribution of b.glucoronidase activity in the rat placenta. *J. Anat.*, **97**: 181-187, 1963.
- BULMER D. Further studies on the granulated metrial gland cells of the pregnant rat. *J. Anat.*, **103** : 479-489, 1968.
- BULMER D. Esterases and acid phosphatase activities in the rat placenta. *J. Anat.*, **99**: 513-525, 1969.
- BULMER D; STEWART J and PEEL S. Endometrial granulocytes of the pregnant hamster. *J. Anat.*, **136**: 329-337, 1983.

- BULMER J.N; MORRISON L; LONGFELLOW M; RITSON A and PACE D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human. Reprod.*, **6**: 791-798, 1991.
- BULMER J.N. Immune cells in decidua, In: *Immunol. Human Reprod.* Kurpisz M; Fernandez N. eds. Oxford Bios Scientific Publishers, Oxford, 313-334, 1995.
- BURNETT T.G and HUNT J.S. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. *J. Immunol.*, **164**: 5245-5250, 2000.
- CHEN H.L; YELAVARTHI K.K and HUNT J.S. Identification of transforming growth factor-beta 1 mRNA in virgin and pregnant rat uteri by in situ hybridization. *J. Reprod. Immunol.*, **25**: 221-233, 1993.
- CHENG H.L; SCHEIDER S.L; KANE C.M; GOLLNICK S.O; GRANDE C; THOMPSON D; PIETRZAK E and TOMASI T.B. TGF- β 2 gene and protein expression in maternal and fetal tissues at various stages of murine development. *J. Reprod. Immunol.*, **25**: 133-148, 1993.
- CLARK D.A. Histocompatibility studies in recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.*, **9**: 1196-1197, 1994.
- CLASSEN-LINKE I; ALFER J; KRUSCHE C.A; CHWALISZ K; RATH W and BEIER H.M. Progestins, progesterone receptor modulators, and progesterone antagonists change VEGF release of endometrial cells in culture. *Steroids.*, **65**: 763-771, 2000.
- COLONNA M; MORETTA A; VÉLY F and VIVIER E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol. Today.*, **21**: 428-431, 2000.
- CORRÊA DA SILVA C.R; JOAZEIRO P.P; YOKOTA S and YAMADA A.T. Granules of Endometrial NK-like cells show a specific lysosomal compartment. *Acta Histochem. Cytochem.*, **29**: 487-488, 1996.
- CORRÊA DA SILVA C. R. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus musculus*) prenhes. Campinas. 1997, 71p. (Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas).
- CROSS J.C; WERB Z and FISHER S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.*, **266**: 1508-1518, 1994.
- CROY B.A and KASSOUF S.A. Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. *J. Reprod. Immunol.*, **15**: 51-69, 1989.
- CROY B.A. Granulated metrial gland cells: interesting cells found in the pregnant uterus. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **23**: 19-21, 1990.

- CROY B.A; REED N; MALASHENKO B.A; KIM K and KWON B.S. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. **Cell. Immunol.**, **133**: 116-126, 1991a.
- CROY B.A; GUILBERT L.J; BROWNE M.A; GOUGH N.M; STINCHCOMB 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 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. Granulated metrial gland cells: hypotheses concerning possible functions during murine gestation. **J. Immunol.**, **27**: 85-94, 1994.
- CROY B.A; LUROSS J.A; GUIMOND M and HUNT J.S. Uterine natural killer cells: insights into lineage relationships and functions from studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. **Nat. Immun.**, **15**: 22-33, 1996-97.
- CROY B.A; ASHKAR A.A; FOSTER R.A; Di SANTO J.P; MAGRAM J; CARSON D; GENDLER S.J; GRUSBY M.J; WAGNER N; MULLER W and GUIMOND M.J. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, **35**: 111-133, 1997.
- CROY B.A; ASHKAR A.A; MINHAS K and GREENWOOD J.D. Can murine uterine natural killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? **J. Soc. Gynecol. Investig.**, **7**: 12-20, 2000a.
- CROY B.A; DI SANTO J.P; GREENWOOD J.D; CHANTAKRU S and ASHKAR A.A. Transplantation into genetically alymphoid mice as na approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy- a review. **Placenta.**, **21**: Suppl A: S77-S80, 2000b.
- CUTURI M.C; ANEGON I; SHERMAN F; LOUDON R; CLARK S.C; PERUSSIA B and TRINCHIERI G. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. **J. Exp. Med.**, **169**: 569-583, 1989.
- DAMJANOV A and DAMJANOV J. Isolation of serine protease from GMG cells of mice and rats with lectin from *Dolichos biflorus*. **J. Reprod. Fert.** **95**: 6779-684, 1992.
- DAVIES J and GLASSER S.R. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anat.**, **69**: 542-608, 1968.

- DELGADO S.R; McBEY B-A; YAMASHIRO S; FUJITA J; KISO Y and CROY B.A. Accounting for the peripartum loss of natural killer cell-like granulated metrial gland cells, from the pregnant mouse uterus. *J. Leuk. Biol.*, **59**: 262-269, 1996.
- DRAKE B.L and HEAD J.R. GM-CSF and CSF-1 stimulate DNA synthesis but not cell proliferation in short-term cultures of murine trophoblast. *J. Reprod. Immunol.*, **26**: 41-56, 1994.
- EMOTO M; ZERRAHN J; MIYAMOTO M; PÉRARNAU B and KAUFMANN S.H.E. Phenotypic characterization of CD8⁺ NKT cells. *Eur. J. Immunol.* **30**: 2300-2311, 2000.
- ENDERS A.C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemocorial placentas. *Am. J. Anat.*, **116**: 29-68, 1965.
- ENDERS A.C and WELSH A.O. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemocorial placenta formation. *J. Exp. Zool.*, **266**: 578-587, 1993.
- ETZLER M.E and KABAT E.A. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichos biflorus*. *Biochemistry.*, **9**: 869, 1970.
- FARIA M and BEVILACQUA E. Cytological aspects of vascular invasion by the trophoblast of *Calomys callosus* in hepatic tissues. *J. Morphol.*, **226**: 159-171, 1995.
- FONSECA P.M. Efeito das condições de cultivo primário sobre células NK uterinas (NKu) e avaliação da sua viabilidade *in vitro*. Campinas. 2000, 101p. (Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas).
- FUKUI K; YOSHIMOTO I; MATSUBARA K; HORI R; OCHI H and ITO M. Leukocyte function-associated antigen-1 expression on decidual natural killer cells in patients with early pregnancy loss. *Mol. Human. Reprod.*, **5**: 1083-1088, 1999.
- GRAHAM C.H; LYSIAK J.J; McRAE K and LALA P.K. Localization of transforming growth factor- β at the human-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.*, **46**: 561-572, 1992.
- GRAY J.D; HIROKAWA M and HORWITZ D.A. The role of transforming growth factor- β in the generation of suppression: an interaction between CD8⁺T and NK cells. *J. Exp. Med.*, **180**: 1937-1942, 1994.
- GREENBERG A.H and LITCHFIELD D.W. Granzymes and apoptosis: targeting the cell cycle. *Curr. Topic. Microbiol. Immunol.*, **198**: 95-112, 1995.
- GRIFFITHS G.M and ARGON Y. Structure and Biogenesis of lytic granules. *Curr Topic. Microbiol. Immunol.*, **198**: 39-58, 1995.

- GRIFFITH J.S; JENSEN S.M; LUNCEFORD J.K; KAHN M.W; ZHENG Y; FALASE E.A; LYTTLE C.R and TEUSCHER C. Evidence for the genetic control of estradiol-regulated responses. Implications for variation in normal and pathological hormone-dependent phenotypes. *Am. J. Pathol.*, **150**: 2223-2230, 1997.
- GUIMOND M.J; WANG B.L; FUJITA J; TERHORST C and 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 and CROY B.A. Absence of natural Killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice. *Biol. Reprod.*, **56**: 169-179, 1997.
- GUIMOND M.J, WANG B and CROY B.A. Engraftment of NK cells reverses the reproductive deficits in pregnant NK cell and T cell deficient TgE26 mice. *J. Exp. Med.*, **187**: 217-223, 1998.
- GUIMOND M.J, WANG B and CROY B.A. Immune competence involving the natural Killer cell lineage promotes placental growth. *Placenta*, **20**: 441-450, 1999.
- GUMPERS J.E and PARHAM P. The enigma of the natural killer cell. *Nature*, **378**: 245-248, 1995.
- HADDAD E.K; DUCLOS A.J and BAINES M.G. Early embryo loss is associated with local production of nitric by decidual mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, **182**: 1143-1152, 1995.
- HEAD J.R. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. *Nat. Immun.*, **15**: 7-21, 1996-97.
- HELD W and RAULET D.H. Ly-49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development. *J. Exp. Med.*, **185**: 2079-2088, 1997.
- HERBERMAN R.B; REYNOLDS C.W and ORTALDO J.R. Mechanism of cytotoxicity by natural killer (NK) cells. *Annu. Rev. Immunol.*, **4**: 651-680, 1986.
- HUANG J; ROBY K.F; PACE J.L and HUNT J.S. Localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J. Leuk. Biol.*, **57**: 27-35, 1995.
- HUNT J.S. Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.*, **16**: 1-17, 1989.
- HUNT J.S. The role of macrophages in the uterus response to pregnancy. *Placenta*, **11**: 467-475, 1990.

- HUNT J.S; MILLER L; VASSMER D and CROY B.A. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. **Biol. Reprod.**, **57**: 827-836, 1997.
- HUNT J.S; PETROFF M.G and BURNETT T.G. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. **Cell & Dev. Biol.**, **11**: 126-137, 2000.
- ISAAZ S; BAETZ K; OLSEN K; PODACK E and GRIFFITHS G.M. Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling on the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. **Eur. J. Immunol.**, **25**: 1071-1079, 1995.
- JANIS K.B; SUSAN H; CHERYL K.L and YAIR A. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. **J. Cell Biol.**, **111**: 2327-2340, 1990.
- JOKHI P.P; KING A and LOKE Y.W. Production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. **Hum. Reprod.**, **9**: 1660-1669, 1994.
- KAGI D; LEDERMANN B; BURKI K; SELLER P; ODERMATT B; OLSON K.J; PODACK E.R and ZINKERNAGEL R.M. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature.**, **369**: 31-37, 1994.
- KARLHOJER F.M; RIBAUDO R and YOKOYAMA W.M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2 activated natural killer cells. **Nature.**, **358**: 66-70, 1992.
- KIMURA M; HANAWA H; WATANABE H; OGAWA M and ABO T. Synchronous expansion of intermediate TcR cells in the liver and uterus during pregnancy. **Cell. Immunol.**, **162**: 16-25, 1995.
- KING A and LOKE Y.W. Uterine large granular lymphocytes: a possible role in embryonic implantation? **Am. Obstet. Gynecol.**, **162**: 308-310, 1990.
- KING A and LOKE Y.W. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. **Immunol. Today.**, **12**: 432-435, 1991.
- KING A; WOODING P; GARDNER L and LOKE Y.W. Expression of perforin, granzyme A and Tia-1 by human uterine CD56⁺ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. **Human Reprod.**, **8**: 2061-7, 1993.
- KING A; BURROWS T and LOKE Y.W. Human uterine natural killer cells. **Nat. Immunol.**, **15**: 41-52, 1996-97.
- KING A; BURROWS T; VERMA S; HIBY S and LOKE Y.W. Human uterine lymphocytes. **Human. Reprod.**, **4**: 480-485, 1998.

- KING A. Recognition of trophoblast HLA classe I molecules by decidual NK cell receptors. **Placenta.**, A. 6, 1999.
- KING A; HILBY S.E; GARDNER L; JOSEPH S; BOWEN J.H; VERMA S; BURROWS T.D and LOKE Y.W. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors- a review. **Placenta.**, 21 Suppl A: 581-585, 2000.
- KIRBY D.R.S. Ectopic autografts of blastocysts in mice maintained in delayed implantation. **J. Reprod. Fertil.**, 14: 515-517, 1967.
- KISO Y; POLLARD J.W and CROY B.A. A study of granulated metrial gland cell differentiation in pregnant, macrophage-deficient, osteopetrotic (op/op) mice. **Experientia.**, 48: 973-975, 1992.
- KISO Y; YOSHIZAWA M; WILSON J.A; MCBEY B.A and CROY B.A. Imuno-histochemical analisis of beta-1 integrin receptors displayed by murine uterine natural killer cells over the course of successful pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, 27: 213-225, 1994.
- KISO Y; KUSAKABE K; TOKUNAGA Y; MAKITA M; OKADA T and SASAKI F. A study of granulated metrial gland cells in the pregnant, alymphoplasia (aly/aly) mice. **J. Vet. Med. Sci.**, 59: 1137-1141, 1997.
- KLAUBER N; ROHAN R.M; FLYNN E and D'AMATO R.J. Critical components of the female reproductive pathway are supressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. **Nat. Med.**, 3: 3443-3446, 1997.
- KURITA T; LEE K; COOKE P.S; TAYLOR J.A; LUBAHN D.B and CUNHA G.R. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. **Biol. Reprod.**, 62: 821-830, 2000.
- LALA P.L; KEARNS M; PARHAR R.S; SCODRA J and JOHNSON S. Immunological role of the cellular constituents of the decidua in the maintenance of semiallogenic pregnancy. **Ann. Ny. Acad. Sci.**, 476: 183-205, 1986.
- LARKIN L.H and FLICKINGER C.J. Ultrastructure of the metrial gland cell in the pregnant rat. **Am. J. Anat.**, 126: 337-354, 1969.
- LARKIN L.H. Electron microscopy of granule release in metrial gland cells of the pregnant rat. **Anat. Record.**, 172: 109-126, 1972.
- LIN P.Y; JOAG S.V; YOUNG J.D; CHANG Y.S; SOONG Y.K and KUO T.T. Expression of perforin by natural killer cells within first trimester endometrium in humans. **Biol. Reprod.**, 45: 698-703, 1991.

- LINNEMEYER P.A and HAMILTON M.S. A monoclonal antibody, 4H12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine decidua. *J. Immunol.*, **17**: 279-294, 1990.
- LINNEMEYER P.A and POLLAK S.B. Stage-specific expression of activation antigens on NK cells at uterine implantation sites in mice. *J. Immunol.*, **153**: 1478-1485, 1994.
- LIU C.C; RAFFI S; GRANELLI-PIPERNO A; TRAPANI J.A and YOUNG J.D-E. Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells: kinetics, mitogen requirements and effect of cyclosporin. *A. J. Exp. Med.*, **170**: 2105-2118, 1989.
- LIU C.C; WALSH M.C and YOUNG E.D. Perforin: structure and function. *Immunol. Today.*, **16**: 194-201, 1995.
- LOKE Y.W and KING A. Decidual natural-killer cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Bioch. Soc. Trans.*, **28**: 196-198, 2000.
- LOWIN B; PEITSCH M.C and TSCHOPP J. Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **198**: 1-20, 1995.
- LYUNGREN H.G and KARRE K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today.*, **11**: 237-244, 1990.
- McKENDRICK J.D and RADOMSKI M.W. Nitric oxide: implications for placental biology. A review. *Trophoblast Res.*, **11**: 193-207, 1998.
- MIKI A; FUJII T; ISHIKAWA Y; HAMAI Y; YAMASHITA T; TADOKORO K; KOZUMA S; JUJI T and TAKETANI Y. Immunotherapy prevents recurrent abortion without influencing natural killer receptor status. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **43**: 98-106, 2000.
- MORETTA A and MORETTA L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**: 694-670, 1997.
- MUKHTAR D.D.Y; STEWART I.J and CROY B.A. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, **15**: 269-701, 1989.
- MULLER C; KAGI D; AEBISCHER T; ODERMATT B; HELD W; PODACK E.R; ZINKERNAGEL R.M and HENGARTNER H. Detection of perforin and granzyme A mRNA in infiltrating cells during infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 1253-1259, 1989.
- MULLER H; LIU B; CROY B.A; HEAD J; HUNT J.S; DAÍ G and SOARES M.J. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine, prolactin-like protein-A. *Endocrinol.*, **140**: 2711-2720, 1999.

- MYLONA P; KIELTY C.M; HOYLAND J and APLIN J.D. Expression of type VI collagen in human endometrium and decidua. **J. Reprod. Fert.**, **103**: 159-167, 1995.
- NAGATA S and GOSTEIN P. The Fas death factor. **Science.**, **267**: 1449-1456, 1995.
- NISHIMURA Y; KAWABATA T and KATO K. Identification of latent procathepsin B and L in microsomal lumen: characterisation of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **261**: 64-71, 1988.
- OHTA Y; SATO T and IGUCHI T. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. **Biol. Reprod.**, **48**: 205-213, 1993.
- OJCIUS D.M and YOUNG J.D.E. Cell-mediated killing: effector mechanisms and mediators. **Cancer Cells.**, **2**: 138-145, 1990.
- OJCIUS D.M; ZHENG L.M; SPHICAS E.C; ZYCHLINSKY A and YOUNG J.D-E. Subcellular localization of perforin and serine esterase in lymphokine-activated killer (LAK) cells and a cytotoxic T cell line by immunogold labelling. **J. Immunol.**, **146**: 4427-4432, 1991.
- PAFFARO Jr.V.A; HARAGUCHI C.M; FONSECA P.M; JACOBUCCI G.B; JOAZEIRO P.P and YAMADA A.T. Glycoconjugates containing N-acetyl-galactosamine expressed by mouse uterine natural killer used as selective cell marker. **Placenta.**, **20**:A. 51, 1999a.
- PAFFARO Jr V.A; JOAZEIRO P.P and YAMADA A.T. Differentiation stages of mouse uNK and their distribution in the uterus during early pregnancy. **Acta Microscopica.**, **8**: 283-284, 1999b.
- PARR E.L; PARR M.B and YOUNG J.D-E. Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. **Biol. Reprod.**, **37**: 1327-1335, 1987.
- PARR E.L; YOUNG L.H.Y; PARR M.B and YOUNG J.D-E. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **J. Immunol.**, **145**: 2365-2372, 1990.
- 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 and HUNT J.S. Synthesis and granular localization of tumor necrosis factor-alpha in activated NK cells in the pregnant mouse uterus. **J. Reprod. Immunol.**, **28**: 31-40, 1995.

- PEEL S and BULMER J.N. The fine structure of the metrial gland in relation to the origin of the granulated cells. *J. Anat.*, **123**: 687-695, 1977.
- PEEL S; STEWART I and BULMER D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. *Cell Tissue Res.*, **223**: 647-656, 1983.
- PEEL S. Granulated metrial gland cells. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **115**: 1-112, 1989.
- PEEL S and BULMER J.N. Lectin histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J. Anat.*, **188**: 197-205, 1996.
- PETERS P.J; BORST J; OORSCHOT V; FUKUDA M; KRAHENERHL O; TSCHOPP J; SEOT J.W and GEUZE H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.*, **173**: 1099-1109, 1991.
- PLATT J.S and HUNT J.S. Interferon- γ gene expression in cycling and pregnant mouse uterus: temporal aspects and cellular localization. *J. Leukoc. Biol.*, **64**: 393-400, 1998.
- PODACK E.R. The molecular mechanism of lymphocyte-mediated tumor cell lysis. *Immunol.*, **6**: 21-27, 1985.
- POLLARD J.W; HUNT J.S; WIKTOR-JEDRZEJCZAK W and STANLEY E.R. A pregnancy defect in the osteopetrotic (op/op) mouse demonstrates the requirement for CSF-1 in female fertility. *Dev. Biol.*, **148**: 273-283, 1991.
- REDLINE R.W. Role of uterine natural Killer cells and interferon- γ in placental development. *J. Exp. Med.*, **192**: F1-F4, 2000.
- REINIUS S. Ultrastructure of blastocyst attachment in the mouse. *Cell. Tissue Res.*, **152**: 525-542, 1967.
- ROBERTSON S.A; ROBERTS C.T; FARR F.L; DUNN A.R and SEAMARK R.F. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Biol. Reprod.*, **60**: 251-161, 1999.
- ROTH C; CARLYLE J.R; TAKIZAWA H and RAULET D.H. Clonal acquisition of inhibitory Ly-49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. *Immunity*, **13**: 143-153, 2000.
- SALAMONSEN L.A. Role of proteases in implantation. *Rev. Reprod.*, **4**: 11-22, 1999.

- SÁNCHEZ J; BUENDIÁ A.J; SALINAS J; BERNABÉ A; RODOLAKIS A and STEWART I.J. Murine granulated metrial gland cells are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection *in vivo*. *Infect. Imm.*, **64**: 3897-3900, 1996.
- SCHLAFKE S and ENDERS A.C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.*, **12**: 41-65, 1975.
- SELYE H and MCKEOWN T. Studies on the physiology of the maternal placenta in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, **119**: 1-31, 1935.
- SHRESTA S; PHAM C.T.N; THOMAS D.A; GRAUBERT T.A and LEY T. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Op. Immunol.*, **10**: 581-587, 1998.
- SLADEK S.M; KANBOUR-SHAKIR A; WATKINS S; BERGHORN K.A; HOFFMAN G.E and ROBERTS J.M. Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta.*, **19**: 55-65, 1998.
- SMITH L.J. Metrial gland and other glycogen containing cells in the mouse uterus following mating and through implantation of the embryo. *Am. J. Anat.*, **119**: 15-24, 1966.
- STALLMACH T; EHRENSTEIN T; ISENMANN S; MULLER C; HENGARTNER H and KAGI D. The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, **25**: 3342-3348, 1995.
- STARKEY P.M; SARGENT I.L and REDMAN C.W.G. Cell populations in human early pregnancy decidua: characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunol.*, **65**: 129-134, 1988.
- STEWART I and PEEL S. The structure and differentiation of granulated metrial gland cells of the pregnant mouse uterus. *Cell. Tissue Res.*, **184**: 517-527, 1977.
- STEWART I and PEEL S. The differentiation of the decidua and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell Tissue Res.*, **187**: 167-179, 1978.
- STEWART I.J and PEEL S. Granulated metrial gland cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anat. Embryol.*, **160**: 227-238, 1980.
- STEWART I.J and PEEL S. Granulated metrial gland cells in the virgin and early pregnant mouse uterus. *J. Anat.*, **133**: 535-541, 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. Differentiation of granulated metrial gland cells in ovariectomized mice given ovarian hormones. *J. Endocrinol.*, **112**: 23-26, 1987.
- 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. Leuk. Biol.*, **50**: 198-207, 1991.
- STEWART I.J and MUKHTAR D.D.Y. Ascanning electron microscopy study of interactions between mouse granulated metrial gland cells and placental trophoblast cells *in vitro*. *J. Anat.*, **184**: 153-156, 1994.
- STEWART I.J. Granulated metrial gland cells in "minor" species. *J. Reprod. Immunol.*, **40**: 129-146, 1998.
- STEWART I and PEEL S. Mouse granulated metrial gland cell cytotoxicity of Wehi 164 cells: Is there a role for Interleukin-3 and tumour necrosis Factor- α ? *Am. J. Reprod. Immunol.*, **41**: 286-292, 1999a.
- STEWART I.J and PEEL S. Effect of serum on mouse granulated metrial gland cell cytotoxicity. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **41**: 286-292, 1999b.
- SU R-C; KUNG S.K.P; GARIÉPY J; BARBER B.H and MILLER R.G. NK cells can recognize different forms of class I MHC. *J. Immunol.*, **161**: 755-766, 1998.
- TAN J; PARIA B.C; DEY S.K and DAS S.K. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinol.*, **140**: 5310-5321, 1999.
- TIBA M.R; CASTELLANI M; JOAZEIRO P.P and YAMADA A.T. Alterações estruturais e constitutivas dos grânulos das células NK uterinas induzidas pela lesão embrionária. *Braz. J. Morphol. Sci.*, **17**(supl):152, 2000.
- TRAPANI J.A. Target cell apoptosis induced by cytotoxic Tcells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin and the serine protease, granzyme B. *Aust. NZ J. Med.*, **25**: 793-799, 1995.
- TRAPANI J.A. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytology lymphocytes. *Intern. Rev. Cytol.*, **182**: 111-193, 1998.
- TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.*, **47**: 187-376, 1989.
- VASSILIADOU N and BULMER J.N. Functional studies of human decidua in spontaneous early pregnancy loss: effect of soluble factors and purified CD56+ lymphocytes on killing of natural killer and lymphokine-activated killer-sensitive targets. *Biol. Reprod.*, **58**: 982-987, 1998.
- VASSILIADOU N; SEARLE R.F and BULMER J.N. Elevated expression of activation molecules by decidual lymphocytes in women suffering spontaneous early pregnancy loss. *Human. Reprod.*, **14**: 1194-1200, 1999.

- VERMA S; KING A and LOKE Y.W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 979-983, 1997.
- WANG C; UMESAKI N; NAKAMURA H; TANAKA T; NAKATANI K; SAKAGUCHI I; OGITA S and KANEDA K. Expression of vascular endothelial growth factor by granulated metrial gland cells in pregnant murine uteri. *Cell Tissue Res.*, **300**: 285-293, 2000.
- WATANABE M; MURAMATSU T; SHIRANE H and UGAI K. Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA) and for Peanut Agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**: 779-790, 1981.
- WELSH A.O and ENDERS A.C. Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *Am. J. Anat.*, **172**: 1-30, 1985.
- WELSH A.O and ENDERS A.C. Trophoblast-decidual cell interaction and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.*, **217**: 203-219, 1987.
- WELSH A.O and ENDERS A.C. Chorioallantoic placenta formation in the rat: II. Angiogenesis and maternal blood circulation in the mesometrial region of the implantation chamber prior to placenta formation. *Am. J. Anat.* **192**: 347-365, 1991.
- 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.
- WHITELAW P.F and CROY B.A. Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta.*, **17**: 533-543, 1996.
- WOOD G.W; KAMEL S and SMITH K. Immunoregulation and prostaglandin production by mechanically-derived and enzyme-derived murine decidual cells. *J. Reprod. Immunol.*, **13**: 235-248, 1988.
- YAMADA A.T. Comportamento de trofoblasto de camundongos em ambiente extra-uterino. São Paulo. 1990, 115p. (Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- YOKOYAMA W.M. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**: 613-635, 1993.
- YOKOYAMA M; SANO M; SONODA K; NOZAKI M; NAKAMURA G.I and NAKANO H. Cytotoxic cells directed against placental cells detected in human habitual abortions by na *in vitro* terminal labeling assay. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **31**: 197-204, 1994.

- YOSHIZAWA M; OKADA Y; MORICAWA Y; SASAKI F and KISO Y. Murine granulated metrial gland cell population in beige (bg/ bg) and SCID (scid/ SCID) Genotypes. *J. Vet. Med. Sci.*, **56**: 415-416, 1994.
- YOUNG J.D-E and COHN Z.A. Killing: a common mechanism. *Cell.*, **46**: 641-642, 1986.
- ZHENG L.M; JOAG S.V; PARR M.B; PARR E.L and YOUNG J.D.E. Perforin-expressing granulated metrial gland cells in murine deciduoma. *J. Exp. Med.*, **174**: 1221-1227, 1991a.
- ZHENG L.M; OJCIUS D.M; LIU C.C and YOUNG J.D-E. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **25**: 72-76, 1991b.
- ZHENG L.M; OJCIUS D.M and YOUNG J.D-E. Perforin-expressing cells during spontaneous abortion. *Biol. Reprod.*, **48**: 1014-1019, 1993.